

Aus der Klinik für Innere Medizin
Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité Campus Buch
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen genomischer Veränderungen von Mammakarzinomzellen mittels Random
Amplified Polymorphic DNA

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Sarantos Papadopoulos
Aus Athen

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr.med. W.-D. Ludwig
 2. Prof. Dr.rer.nat. H. Lehrach
 3. Prof. Dr.med. H. Stein

Datum der Promotion: 19 März 2001

INHALT

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
2	ABSTRACT	6
3	EINFÜHRUNG	7
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	7
3.2	RAPD	10
3.3	RAPD UND KREBS	14
3.4	ZIELE DER ARBEIT	17
4	MATERIAL UND METHODEN	20
4.1	MATERIAL UND GERÄTE	20
4.1.1	<i>Feste Chemikalien</i>	20
4.1.2	<i>Flüssige Chemikalien</i>	20
4.1.3	<i>Standardpuffer und Lösungen</i>	20
4.1.4	<i>Biochemikalien, Enzyme und Standards</i>	22
4.1.5	<i>Gebrauchsfertige Kits</i>	24
4.1.6	<i>Verbrauchsmaterial</i>	24
4.1.7	<i>Humanes Gewebe</i>	25
4.1.8	<i>Geräte</i>	25
4.2	METHODEN	26
4.2.1	<i>Aufarbeitung von DNA aus EDTA behandeltem Vollblut</i>	26
4.2.2	<i>Proteinase K/Phenol/Chloroform-Methode</i>	26
4.2.3	<i>Phenolextraktion</i>	27
4.2.4	<i>Präzipitieren von DNA</i>	28
4.2.5	<i>Rapid-Methode zur DNA Isolation(Lahiri and Nurnberger 1991)</i>	28
4.2.6	<i>Bestimmung der DNA-Konzentration</i>	29
4.2.7	<i>Chelex[®](Biorad)(Walsh, Metzger et al. 1991)</i>	29
4.2.8	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis(PFGE)(Barlow 1992)</i>	30
4.2.9	<i>Isolation von Lymphozyten</i>	31
4.2.10	<i>Aufarbeitung von DNA aus Vollblut und Gewebe</i>	32
4.2.11	<i>Die Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	32
4.2.12	<i>Durchführung der Polymerasekettenreaktion</i>	33
4.2.13	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	33
4.2.14	<i>Analyse des Gels</i>	34
4.2.15	<i>Klonierung und Sequenzierung der Fragmente</i>	34
4.2.16	<i>DNA Analyse</i>	35
4.2.17	<i>CAA(Chloracetaldehyd)</i>	35

5	RESULTATE	36
5.1	ZYKLENANZAHL	36
5.2	DNA KONZENTRATION	37
5.3	DNA ISOLIERUNGSMETHODE	40
5.4	MISCHUNG VON HUMANER MIT HUMANER DNA UND HUMANER MIT BAKTERIELLER DNA.	41
5.5	Mg^{+2} -, PRIMER - UND KCL KONZENTRATIONEN	43
5.6	PCR ADDITIVA	44
5.7	HEISSER START (HOT START)	45
5.8	PAD	45
5.9	DENATURIERUNGSTEMPERATUR UND ÜBERGANG ZUR ANLAGERUNGSTEMPERATUR	46
5.10	ANLAGERUNGSTEMPERATUR	48
5.11	RAMPE	50
5.12	EXTENSIONSZEITEN	52
5.13	PROGRAMMVERÄNDERUNGEN	53
5.14	ENZYME	54
5.15	PCR MASCHINEN	62
5.16	VISUALIERUNGSMÖGLICHKEITEN DER DNA	65
5.17	DYNAMIN	65
6	DISKUSSION	69
6.1	ZYKLEN	69
6.2	DNA KONZENTRATION	69
6.3	DNA ISOLIERUNGSMETHODEN	70
6.4	Mg^{+2} -, PRIMER - UND KCL KONZENTRATIONEN	70
6.5	DENATURIERUNG	71
6.6	ANLAGERUNGSTEMPERATUR/ZEITEN	72
6.7	RAMPE	73
6.8	EXTENSIONSZEITEN	74
6.9	ENZYME	74
6.10	PCR MASCHINE	76
6.11	PAD, HEISSER START, PCR ADDITIVA, VISUALISIERUNGSMÖGLICHKEITEN DER DNA, PCR PROGRAMMVERÄNDERUNGEN	77
6.12	PRIMER	78
6.13	DYNAMIN	89
7	ZUSAMMENFASSUNG	91
8	AUSBLICK	92
9	ERKLÄRUNG	93

1 ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit wurde die random amplified polymorphic DNA (RAPD) Methode für die Anwendung humaner DNA optimiert, indem die Konzentrationen der einzelnen Agentien und das thermische Profil der PCR-Reaktion verändert wurden. Des weiteren wurde der Einfluss von Polymerasen und PCR-Maschinen auf die RAPD, insbesondere auf die Erweiterung des Spektrums der Amplimere und die Reproduzierbarkeit der Reaktionen untersucht. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die RAPD eine sehr robuste und reproduzierbare Methode ist. Im zweiten Teil wurden qualitative und quantitative Unterschiede zwischen DNA von Brustkrebszellen und DNA von Leukozyten detektiert. Die dazu benutzten Primer basieren auf Sequenzen die in den Mechanismen der Tumorgenese involviert sind. Unsere Studie hat gezeigt, dass random priming in der Abschätzung von genomischen Schäden im Brustkrebs sehr nutzbar sein kann.

2 ABSTRACT

In the first part of this work, we have optimized random amplified polymorphic DNA (RAPD) for the use of human DNA in altering the concentration of the reaction components and the steps of the thermal profile in the polymerase chain reaction, by testing a large number of polymerases and multiple combinations with respect to their ability to increase the spectrum of amplimers and by examining the performance of various thermocyclers. We conclude that RAPD is a robust and reproducible method that could prove very useful for scientists and physicians. In the second part we used primers that were designed by choosing sequences involved in the development of DNA mutations, to successfully detect qualitative and quantitative differences between breast cancer DNA/normal DNA pairs. Our study showed that random priming proves very useful for assessing genomic damage in breast cancer.

3 EINFÜHRUNG

Die Rolle der genetischen Veränderungen in der Neoplasie ist schon seit mehr als 100 Jahre Grundlage von Diskussionen. Die erste systematische Studie über die Zellteilung in malignen Tumoren wurde im Jahre 1890 durch von Hanseemann durchgeführt, der auf die höhere Frequenz von Mitosen in Krebszellen aufmerksam gemacht hat und dieses Phänomen als Diagnosekriterium von Malignomen vorschlug. Ungefähr 25 Jahre später, im Jahre 1914, veröffentlichte Boveri die Hypothese, gestützt auf Mikroskopuntersuchungen, dass die Eigenschaften der Krebszellen auf Veränderungen der Chromosomen zurückzuführen sind. Im Laufe dieses Jahrhunderts wurde diese Hypothese durch eine Reihe von Beobachtungen gestützt: a) beim Menschen sind eine Reihe von Tumorformen bekannt, die nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden; b) viele Neoplasien weisen ganz spezifische Veränderungen ihres Chromosomensatzes auf; c) Patienten mit einem defekten DNA-Reparatursystem sind zur Tumorentwicklung prädisponiert; und schliesslich d) die meisten Karzinogene induzieren als Mutagene auch Veränderungen der DNA. In den letzten zwei Jahrzehnten konnte dieses Konzept der Tumorgenese mithilfe des Einsatzes von molekularbiologischen Methoden, der Zellgenetik und Zellhybride, einer experimentellen Überprüfung zugänglich gemacht werden, die die Entwicklung von präzisen Modellen der Carcinogenese ermöglichte.

Die Krebsforschung hat zeigen können, dass Mutationen die positiven Regulatoren des Wachstums oder Überlebens aktivieren und die entsprechenden Faktoren mit einer negativen Rolle inaktivieren (Bishop 1995). Die Untersuchung der Retroviren und der hereditären Krebsformen führten zu Entdeckung zweier Genarten, den Oncogenen und Antioncogenen (auch Tumorsuppressorgene genannt). Die selben Gene spielen aber auch sehr oft eine Rolle bei den "sporadischen" (nicht hereditären) Tumoren des gleichen Typs (z.B. Retinoblastom). Mit der Identifizierung dieser Gene und dem Studium des Ablaufs der Initiation und Progression der menschlichen Tumore konnte die schon etwas ältere Hypothese von Forell aus dem Jahre 1958 bestätigt werden, dass die Tumorgenese ein mehrstufiger Prozess ist. Dazu trug massgeblich das Modell der colorectoralen Tumorgenese von Vogelstein (Fearon and Vogelstein 1990) bei, in dem angenommen wird, dass genetische Veränderungen und deren Akkumulation die stufenweise Umformung des normalen Epithels in proliferatives und später in dysplastisches verursachen. Die Folgen beinhalten die Bildung von Adenomen, Adenokarzinomen und letztlich die Metastasierung.

3.1 Molekularbiologische Methoden

Genetischen Unterschiede können mittels verschiedener Techniken festgestellt werden. Für die Detektion von spezifischen Mutationen wurden Methoden entwickelt wie z.B. die allelspezifische Oligonukleotid Hybridisierung, und für die Suche von Mutationen in kleinen DNA Fragmenten wurden Methoden wie die SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) und die DGGE (Density Gradient Gel Electrophoresis), die auf die Konformationsänderung der mutierten DNA basieren, eingeführt. Für das Untersuchen ganzer Genome gibt es nur wenige etablierte Methoden. Neben den klassischen genetischen Methoden wie Familienuntersuchungen, wurden nun molekularbiologische Verfahren etabliert. Zu diesen zählt das DNA Fingerprinting, das als vergleichende Analyse von eng verwandten Genomen vor allem in der Gerichtsmedizin schon breite Anwendung gefunden hat.

Das konventionelle Fingerprinting besteht aus dem Restriktionsverdau der DNA und die Southernblot Hybridisierung mit multiplen tandem-repetitiven oder hypervariablen Minisatelliten und produziert komplexe Muster. Alternativ, Proben können Locus spezifisch für individual hypervariable Loci sein und einfachere Muster produzieren mittels Detektion von Allelen von einzelnen oder multiplen Loci. Unter Berücksichtigung der VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats (Jeffreys, Wilson et al. 1985)) konnte die Methode zur Feststellung von Polymorphismen bei maligner Transformation (Thein 1987) und für Studien über die Klonalität von primären und metastasierten Tumoren (Smit, Cornelisse et al. 1988) verwendet werden.

Durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen von polymorphen Minisatelliten Loci konnte der Verlust der Heterozygotie, auch bekannt als LOH (Loss of Heterozygosity), festgestellt werden. Dieser Verlust wird als Marker für die Abwesenheit von funktionalen Tumorsuppressorgenen interpretiert (Fearon and Vogelstein 1990).

Die Allelotypisierung (Vogelstein 1989), d.h. die Analyse von Markern auf autosomalen Chromosomen der Tumorzellen, um die Prävalenz der Deletionen von Allelen festzustellen, hat sich als sehr wichtig für die Identifizierung und anschließende Charakterisierung des RB (Retinoblastom)- und des p53 Gens sowie das Einläuten der Tumorsuppressorgens Ära herausgestellt.

Ein weiterer Fortschritt des DNA-Fingerprintings wurde durch die Einführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) erzielt. Hierdurch konnten Mutationen wie z.B. LOH (Verlust der Heterozygotie) durch Amplifikation von hochinformativen Minisatelliten Loci festgestellt werden.

Aber Verluste von genetischem Material machen nur die Hälfte der Veränderungen aus, die man in der Mehrzahl der Tumorzellen findet. Wie vor kurzem gezeigt wurde, ist die Anzahl der moderate Gewinne der chromosomalen Sequenzen genauso häufig wie die der Verluste,

zumindest im Colon-Ca (Malkhosyan, Yasuda et al. 1998). Chromosomale Gewinne können diagnostische Indikatoren der Präsenz von dominanten Onkogenen wie z.B. C-k-ras sein. Die Tatsache, dass moderate Gewinne (z.B. vergleichbar einer Trisomie/Tetrasomie) von chromosomalen Fragmenten mit der Neoplasieentstehung in Verbindung stehen, ist schon seit längerem bekannt (Spira, Wiener et al. 1979). Chromosomale Gewinne können auch zur Überexpression von Genen führen, die zur Tumورprogression beitragen. Die Detektion solcher moderater chromosomaler Veränderungen hat sich als eine Herausforderung in der Krebsforschung herausgestellt. Eine Konsequenz ist, dass die "pathogenetische Bedeutung solcher Abnormalitäten total unbekannt ist", wie Mitelman et. al. kürzlich betonte (Mitelman, Mertens et al. 1997). Mit anderen Worten, die Hälfte der Genomalterationen der Tumorzellen entzieht sich der Entdeckung und der Untersuchung, weil keine adäquaten Techniken bis heute zur Verfügung stehen.

Technische Fortschritte der molekularen Tumorgenetik, wie die Representation Differential Analysis (RDA), eine wirksame Methode für die Identifizierung und Isolierung von über- und unterrepräsentierten Sequenzen im Genom (Lisitsyn, Lisitsina et al. 1995), oder LOH-Analysen durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen oder Mikroallelotypisierungsprozeduren (Vogelstein 1989), sind nicht in der Lage moderate Gewinne eines Genoms nachzuweisen. Verbesserungen, um die PCR quantitativ zu machen, wurden bei der Mikroallelotypisierung eingesetzt, indem man jedoch dessen einfache Praktikabilität opferte. Die RDA auf der anderen Seite ist eine schwer durchzuführende Methode und braucht zwei getrennte Experimente um DNA Verluste und Gewinne zu detektieren. Eine weitere Einschränkung ist die Tatsache, dass diese Veränderungen homozygot sein müssen.

Eine weitere Methode, die die Einschätzung der chromosomalen Aberrationen respektive der Anzahl und der Struktur erlaubt, ist die komparative Genomische Hybrisierung (CGH) (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1992). Obwohl Genamplifikationen, Genomgewinne also, hiermit detektierbar sind, werden für die CGH spezielle Instrumente benötigt und ausserdem können nur Alterationen von relativ langen chromosomalen Regionen nachgewiesen werden. Die untere Grenze liegt bei 5-10 Mbp. Der entscheidende Nachteil der komparativen Hybridisierung besteht in der Identifizierung und Clonierung der veränderten Sequenzen, die sich sehr schwierig gestalten können.

Wie schon erwähnt, konnten durch die PCR Mutationen analysiert werden, die mit der Tumorentstehung assoziiert sind. Aber auch mit der Hilfe von PCR, erfordert die Darstellung von Fingerprints und die Feststellung von Polymorphismen erheblichen experimentellen Aufwand und Wissen über die Sequenz der benutzten DNA. Um diese Anforderungen zu

umgehen, entwickelten Williams et al. (Williams, Kubelik et al. 1990) die Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

3.2 RAPD

Die Methode basiert auf der Amplifikation von Sequenzen durch einen oder zwei nach Zufallskriterien ausgewählten Primern, die eine durchschnittliche Länge von 10 Nukleotiden aufweisen. Das Andocken/Annealing der Primer ist an vielen Orten (Loci) der DNA möglich und bedingen, wenn diese Primingorte sich in einer Entfernung von bis zu 5kb befinden, dass die dazwischenliegenden Sequenzen amplifiziert werden.

Der molekulare Mechanismus, der das RAPD-Phänomen steuert, ist zur Zeit nicht genau bekannt. Venugopal et al. (Venugopal 1993) konnten Ende 1993 erstmals zeigen, dass die ca. 10 Nukleotide langen Primer an perfekte oder nicht-perfekte inverted repeat binden. Diese repetitiven Sequenzen flankieren die Genomanteile, die später amplifiziert werden.

Während RFLPs im konventionellen DNA Fingerprinting aus Basenpaarveränderungen resultieren, die die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen alterieren, ist bei der RAPD die DNA Sequenz bei den Primingpositionen diejenige, die verändert werden. Die Konsequenz ist eine Variierung der Anzahl und Länge der Amplifikationsprodukte. Das erneute Auftreten oder das Verschwinden dieser Primingpositionen kann durch Nukleotidsubstitutionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen stattfinden. Auch der Abstand zwischen zwei Primingpositionen kann durch Deletionen oder Insertionen derart verändert sein, dass die Amplifikation unmöglich wird. Aber auch jede zusätzliche Konformationsänderung des DNA Moleküls, die die Effizienz des Primings und somit der Amplifikation beeinflusst, kann die Ursache von Polymorphismen sein. In diesem Fall würde ein Polymorphismus vorgetäuscht werden.

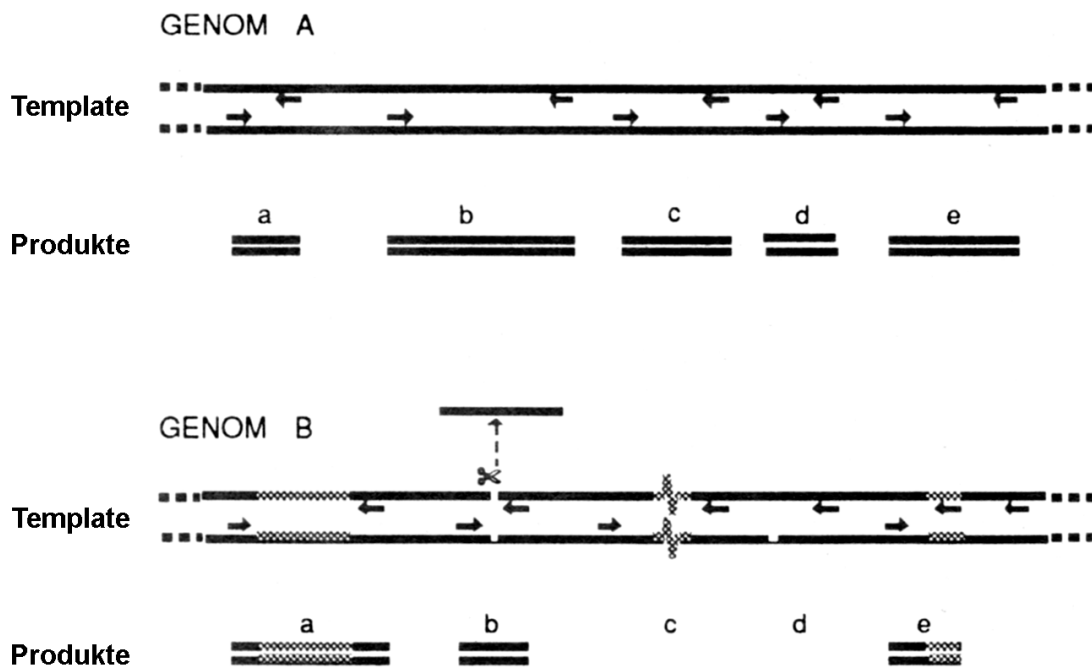


Abb. 1: DNA Mutationen wie Insertionen, Deletionen, Inversionen, Einzelbasensubstitutionen können das RAPD Produktprofil beeinflussen.

RAPD Fingerprints weisen Banden auf, die in zwei Kategorien aufgeteilt werden können: diejenigen, die phylogenetisch konserviert sind und die, die individuell spezifisch sind. Diese Tatsache deutet an, dass die Primingpositionen zufällig im Genom verteilt sind, und dass sie konservierte und hochvariable Regionen flankieren. Da bei der Tumorgenese die oben benannten genetischen Alterationen auftreten, kann die RAPD von grossem Nutzen sein.

Die stattfindende Amplifikation ist zwar willkürlich, da sie von willkürlich ausgewählten Primern dirigiert wird, sie ist aber nicht zufällig. Diese in vitro Klonierung der Sequenzen erfolgt über 35 PCR-Zyklen und ergibt ein Bandenmuster, das nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen mit Ethidiumbromid gefärbt und durch UV-Licht sichtbar gemacht wird.

1990 wurde zusätzlich zur RAPD noch eine Schwestermethode vorgestellt: die Arbitrarily-Primed PCR (AP-PCR) (Welsh and McClelland 1990). Das Prinzip ähnelt dem der RAPD, jedoch sind die Primer 18 Nukleotide lang oder länger und die Banden können auf Polyacrylamidgelen mit Radioaktivität und Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Die AP-PCR besteht aus anfänglichen niedrig stringenten Zyklen mit erniedrigte Annealing Temperatur, die DNA von hochstringenten Zyklen gefolgt werden. 1991 beschreiben Caetano-Anolles et. al. (Caetano-Anolles, Bassam et al. 1991) eine weitere Abweichung von der anfänglichen Methode, nämlich das DNA-Amplification-Fingerprinting (DAF), das mit 5-6

Nukleotid langen Primern durchgeführt wird und eine Silberfärbung der Muster auf den Polyacrylamidgelen zur Visualisierung benutzt.

Die RAPD weist Vorteile gegenüber ihren Schwestermethoden auf. Der sichtbare Nachweisbereich erstreckt sich bei der RAPD von ca. 0.5 bis 5kb und ist damit grösser als bei den vergleichbaren Methoden der AP-PCR und dem DAF, die einen Bereich von 0.1 bis 1kb abdecken. Durch den Verzicht auf radioaktive Isotope, die bei der AP-PCR benötigt werden und der Densitometrie nach einer Silberfärbung, wie sie für die DAF angegeben wird, werden zum Durchführen der RAPD nur Geräte (UV-Transilluminator) und Materialien (Ethidiumbromidlsg.) benutzt, die in jedem molekularbiologisch eingerichteten Labor ohnehin zur Verfügung stehen.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die RAPD Methode interne Kontrollen beinhaltet. Auf den Gelen können Banden beobachten werden, die sowohl bei der Amplifikation des gesunden als auch des tumorösen Gewebes eines Individuums vorkommen, aber nicht bei anderen Personen. Die Banden representieren Polymorphismen, die dazu benutzt werden können, um eventuelle Fehler beim Arbeiten (Handling) mit den Proben zu erkennen, speziell wenn die Anzahl der Proben sehr gross ist.

Im Kontrast zu anderen Klonierungsmethoden brauchen bei der RAPD die Deletionen für ihre Erkennung und Isolation nicht homozygot zu sein. Aber auch wenn die Deletion homozygot ist, was mit dem vollständigen Fehlen einer Bande einhergeht, kann sie dedektiert werden. Wie bei Peinado et al. (Peinado, Malkhosyan et al. 1992) sollte eine homozygote Deletion von 0,1 % des Genoms mit ungefähr 20 unterschiedlichen Primern identifizierbar sein. Diese Kalkulation beruht auf dem Mittelwert von ca. 50 unabhängigen Regionen, die mit einem Primer erfasst werden können. Auf diesem Weg kann die Länge der Deletion durch die Analyse der Banden und die Anzahl der Primer, die zur Identifikation notwendig sind, ermittelt werden. Man kann sich also mit 20-40 Primer eine kurze Übersicht über die Situation des Genoms verschaffen.

Die RAPD weist nicht nur Vorteile gegenüber den bekannten Varianten auf, sondern auch gegenüber anderen molekular-biologischen Methoden. Obwohl die RAPD eine Methode ist, die auf der PCR basiert, werden für die Amplifikation keine Vorkenntnisse über die entsprechende DNA Sequenzen benötigt. Ausserdem benötigt man für die Amplifikation sehr niedrige DNA Mengen, die sich zwischen 10 und 500 ng bewegen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Banden, die den Unterschied zwischen den RAPD-Profilen z.B. zwei unterschiedlicher Organismen ausmachen, einfach und direkt kloniert werden können. Die Banden können aus dem Gel einfach ausgeschnitten, aufgereinigt und aufbewahrt werden, um später kloniert zu werden. Im Gegensatz zu den Banden, die beim Fingerprinting von polymorphen Minisatelliten auftreten, da diese Methode auf der Southernblothybridisierung von genomischer DNA basiert.

Die RAPD Methode hat sich in den letzten 9 Jahren als ein effektives molekularbiologisches Werkzeug herausgestellt und Anwendung in vielen Bereichen gefunden hat, wie die Genkartierung (Sobral 1993), Populations- (Russell, Hosein et al. 1993) und Stammbaumanalyse (Dweikat 1993). Sie wurden häufig angewandt, um genetische Fingerabdrücke von Bakterien (Akopyanz, Bukanov et al. 1992), Pilzen (Kersulyte, Woods et al. 1992), Parasiten (Steindel, Dias Neto et al. 1993), Insekten (Kambhampati, Black et al. 1992), Pflanzen (Williams, Kubelik et al. 1990) und Säugetieren (Gwakisa, Kemp et al. 1994) herzustellen und so zwischen den Spezies aber auch intraspezifische Variationen festzustellen. Darüberhinaus wurde das random priming erfolgreich in der Taxonomie (Kresovich 1992) und in phylogenetischen Studien (Dooley, Harrison et al. 1993) eingesetzt. Im Gegensatz dazu existieren nur wenige Daten über humane DNA (Riedy, Hamilton et al. 1992; Sineo, Martini et al. 1993). In letzter Zeit nimmt hier auch die Anzahl der Arbeiten zu, die in unterschiedlichen Richtungen vorgehen. Bei Kindern, die nach dem Disaster von Tschernobyl geboren wurden, konnten in den genetischen Abdrücken, die mittels RAPD angefertigt wurden im Vergleich zu ihren Geschwistern, die vor dem Unglück zur Welt kamen oder zu Kindern von Kontrollfamilien aus derselben Region (Teile der Ukraine, 300-600 Km von Tschernobyl entfernt), die nicht der Radioaktivität ausgesetzt waren, neue Banden detektiert werden (Weinberg 1997). Das Potential dieser Methode ist bei weitem noch nicht ausgeschöpft, primär weil immer noch Zweifel über die Reproduzierbarkeit bestehen. Ein weiterer Punkt ist die Empfindlichkeit der Methode gegenüber Kontaminationen, die noch ungeklärt ist.

3.3 RAPD und Krebs

Mit Hilfe des Random primings und der folgenden Einschätzung der Bandenverluste oder -gewinne, war man in der Lage einen molekularen Karyotyp der Tumorzelle zu entwickeln, der "Amplotype" (ergibt sich vom Wort Amplifikation) genannt wurde (Malkhosyan, Yasuda et al. 1998). Die Amplotypisierung ist für die Detektion von Allelenverlusten nicht so sensitiv, weil sie keine Heterozygotieverluste detektieren kann ohne gänzlichen Verlust des genetischen Materials in dem amplifizierten DNA-Abschnitt. Die Methode zeigt z.B. bei Verlust des einen Allels und die Duplikation des anderen, oder nach mitotischer Rekombination, keine Abnormalität des Bandenmusters auf den Gelen an.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass fast alle autosomalen Chromosomen durch die AP-PCR einem Screening unterzogen werden, indem man alle Banden des Musters lokalisieren konnte. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass angebliche Allelenverluste, die mit der Allelotypisierung detektiert wurden, in Wirklichkeit Gewinne des anderen Allels waren. Das normale Allel wurde so fälschlich als deletiert charakterisiert, eine Tatsache, die durch Random priming und Southernblot hybridisierung bestätigt wurden.

Das Random Priming kann wegen seiner Fähigkeit alterierte Gene zu detektieren benutzt werden, um das Ausmaß des genomischen Schadens der Tumorzellen zu schätzen. Bei einer Einschätzung der genetischen Schäden mittels AP-PCR und des prognostischen Wertes dieser Methode beim metastasierten Colon-Ca wurde festgestellt, dass ungefähr 30% der produzierten Banden Intensitätsunterschiede aufweisen (Arribas 1997). Diese Proportion spiegelt die Fraktion des Tumorzellgenoms wieder, die Veränderungen in der Kopienzahl durchgemacht hat. Verluste, die durch AP-PCR festgestellt wurden, betrafen 13% aller analysierten Banden.

Bei der Allelotypisierung erreichten die Verluste höhere Werte von ungefähr 20 %, eine Differenz, die durch technische Unterschiede erklärbar ist. Chromosomalen Gewinne waren gehäuft und betrafen 16 % der analysierten Banden. Interessant waren auch die Beobachtungen, dass Tumore mit ras Mutationen wenige Intensitätsunterschiede zwischen Banden und Bandengewinne aufweisen, was mit den Tatsachen übereinstimmt, dass ras Mutation-positive Tumoren einen niedrigeren DNA Gehalt haben als ras-negative Tumore (Offerhaus 1992) und dass ras-negative Tumore eine höhere Anzahl von genetischen Alterationen brauchen als ras-positive. Im Gegensatz dazu konnte zwischen p53 und durch AP-PCR detektierbare genetischen Schäden keine Relation hergestellt werden. Als letztes konnte ein aggressives Verhalten von Tumorzellen festgestellt werden, wenn die Bandenverluste, -gewinne und Intensitätsunterschiede ein gewisses Mass übertrafen. Der

Grad der genetischen Schäden, die mittels AP-PCR Fingerprinting analysiert wurden, korreliert mit molekularen phenotypischen und prognostischen Variablen.

Die grösste Leistung des Random Priming ist die Entdeckung einer dritten Art der Karzinogenese nach den Protoonkogenen und den Tumorsuppressorgenen, den „Mutator Phenotyps“ oder anders gesagt Mutationen in DNA Reparatursystemen. Die AP-PCR Methode hat die entscheidende Rolle in der Entdeckung des Mikrosatelliten Mutator (MMP) der Karzinogenese in sporadische und familiäre Kolonkarzinome gespielt (Ionov, Peinado et al. 1993). Die Detektion von Bandenunterschiede führte zur Aufdeckung einer tumorspezifischen Akkumulation von hunderttausenden somatischen klonalen Mutationen. Diese das gesamte Genom charakterisierende Instabilität der repetitiven Sequenzen wird als Grundlage des Mutator Phenotyps für manche sporadischen und familiären Tumorarten des Colocarzinoms angesehen. Seit der Beobachtung, dass in colorectalen Carcinomen Verluste des Chromosoms 17 häufig sind (Peinado, Malkhosyan et al. 1992) wurde die AP-PCR mehrfach eingesetzt, um unterschiedliche Tumortypen zu studieren. Saitoh et al (Saitoh, Bruner et al. 1998) benutzten die AP-PCR, um genetische Alterationen in Astrozytome zu analysieren und beschrieben eine Region auf dem Chromosom 6p21.1, die häufig homozygot deletiert ist, was auf die Anwesenheit eines Tumorsuppressorgens in dieser Region hinweist. Kohno et al. (Kohno, Morishita et al. 1994) haben auch mittels AP-PCR eine homozygote Deletion auf dem Chromosom 2q33 einer kleinzelligen Lungenkrebszelllinie entdeckt. Diese Region war auch bei anderen Krebsarten wie colorectalen Carcinomen, Neuroblastomen und nichtkleinzelligen Lungen-Carcinomen betroffen. Eine Tatsache, die auch hier für ein benachbartes bis heute unbekanntes Tumorsuppressorgen spricht.

Achille et al. (Achille, Biasi et al. 1996) entdeckten eine homozygote Deletion auf dem Chromosom 7q in Pancreas-Carcinomzellen, die auf 80% d.F. vorkommt. Kawakami et al. (Kawakami, Yasuda et al. 1998) untersuchten mittels AP-PCR nichtkleinzellige Lungenkrebsproben und fanden die Intensitätsabnahme einer Bande, die dem Chromosom 10 zugeschrieben wird; ein Hinweis darauf, dass in der Nähe ein Tumorsuppressorgen liegen kann.

Die Anwendung der AP-PCR (Malkhosyan, Yasuda et al. 1998) beim metastasierten Colon-Carcinom hat gezeigt, dass Verluste der Chromosome 1, 9, 14 und 18 häufig sind, was schon von der traditionellen Allelotypisierung bekannt war. Es wurde aber auch zum ersten Mal gezeigt, dass Allelenverluste des Chromosoms 4 in Metastasen vorkommen, die auch als schlechter prognostischer Indikator zu werten sind. In der selben Studie wurden Gewinne der Chromosomen 8q und 13q mit einer Häufigkeit von 75% beschrieben. Gewinne des

Chromosoms 8 wurden mit einer Frequenz von 20–50% in der Region bisher angegeben, was für die Sensitivität der AP-PCR spricht. Die im Colon-Carcinom amplifizierte 8q Region ist nahe am myc Protoonkogenlocus. Dies impliziert, dass das myc Gen entweder eine wichtigere Rolle in der Colonicarcinogenese spielt als bisher angenommen, oder das in der Nähe des myc Gens andere Gene liegen, die für die Tumorgenese relevant sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Gewinne des Chromosoms 6 metastasenspezifisch sind.

Bei squamösen Kopf- und Halscarcinomen korrelierte eine höhere Rate genomischer Instabilität mit wenig differenzierten Carcinomgruppen (Maeda 1999). Yokota's Gruppe (Okazaki, Takita et al. 1996) untersuchte zwei kleinzellige Lungenkrebszelllinien mit mehreren AP-PCR Primern und fand, dass amplifizierte Banden in einer Zelllinie dem Chromosom 8 zuzuordnen sind, während in der anderen Zelllinie die amplifizierten Banden dem Chromosom 2 aufgezeichnet worden sind. Die Region auf dem Chromosom 8 korrespondiert wahrscheinlich mit dem c-myc, während in der Region auf dem Chromosom 2 kein zur Zeit bekanntes krebsrelevantes Gen identifiziert werden konnte. Kuchiki et al (Kuchiki 1999) analysierte die Amplifikation eines Fragments in Proben eines mediastinalen Fibrosarkoms, das dem Chromosom 12q13–q15 zugerechnet werden konnte. Auf dieser Region existieren 2 bekannte Gene, die mit der Carcinogenese in Verbindung gebracht worden sind, nämlich MDM2 und IFNG. Mittels Southern Blotting konnte gezeigt werden, dass das MDM2 Gen zusammen mit dem Fragment amplifiziert wird. DNA-Unterschiede also, die mit dem AP-PCR Fingerprinting festgestellt werden, können zu einfachen Identifizierungen von Kandidatengenen führen, die in der Carcinogenese involviert sind. De Juan et al (de Juan 1999) benutzten die AP-PCR, um amplifizierte DNA-Fragmente in nichtkleinzelligen Lungenkrebsproben zu charakterisieren. Das Vorhandensein des isolierten DNA-Fragments auf dem Chromosom 6q 12 konnte mit einem kürzeren disease-free Intervall korreliert werden. In Gehirntumoren (7 Meningeomen und 21 von 27 Gliomen) konnten Dil-Afroze et al. (Dil, Misra et al. 1998) multiple genomische Alterationen feststellen.

Bei der RAPD ist per Definition die Primerwahl nicht auf eine bestimmte Sequenz festgelegt. Deshalb werden von einigen Autoren Primer entworfen, die Sequenzen beinhalten, um bestimmte Motive zu amplifizieren, z.B. Alu-Sequenzen oder t-DNA Längenpolymorphismen. Solche Primer wurden aber bisher hauptsächlich in der Taxonomie oder Polymorphismusstudie benutzt. Einen Versuch in dieser Richtung hat Yasuda et al (Yasuda, Kashiwabara et al. 1996) durchgeführt, in dem er einen Primer mit einer Sequenz, die theoretisch eine Region des p53 Gens amplifizieren sollte, entworfen hat. Dieser Primer stellte sich als informativ heraus, aber keine der intensiven Banden, die anschliessend sequenziert wurden, entsprachen p53. Sicherlich wäre hier ein Versuch mit zwei Primern angebracht, so dass sich die Distanz der beiden entgegengesetzten Anlagerungsorte bei erhöhten Chancen einer Amplifikation der gewünschten Sequenz verringern würde. Kohno et

al. (Kohno, Kawanishi et al. 1998) führten AP-PCR Experimente nach einem Verdau der DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen durch. Auf diese Art konnten hypermethylierte Bereiche in Lungenkrebszelllinien verschrieben werden, die auch in Lungentumoren hypermethyliert waren. Weitere mögliche Modifikationen der Methode bestehen in der Digestion mit Restriktionsenzymen, z.B. Alu I, der zu amplifizierenden DNA, was zu einer Zunahme der Unterschiede führt (Koebner 1995). Auf diese Art (Sood and Buller 1996) konnte festgestellt werden, dass genomische Instabilität bei ovariellen Tumoren häufiger vorkommt als angenommen (53% anstatt 37%). Abnormale AP-PCR Muster wurden mit höherem Malignitätsgrad und familiären Krebs assoziiert. Deb et al. (Deb 1999) haben 1999 erfolglos versucht retroviral relevante DNA Polymorphismen bei Schizophreniepatienten festzustellen. Sie kommen zu dem Schluss, dass die generelle Abwesenheit von RAPD Polymorphismen ihre Ursache darin hat, dass andere Chromosomumlagerungen als Inversionen mit der Evolution des humanen Genoms assoziiert sind.

Die mögliche Feststellung von heterozygoten oder auch homozygoten Verlusten oder Gewinnen an Genomanteilen in Tumorzellen gegenüber normalen Zellen garantiert nicht, dass diese Sequenzen an Gene gekoppelt sind, die in der Tumorgenese eine aktive Rolle spielen. Auf der anderen Seite sind diese Sequenzbereiche den selben genetischen Veränderungen unterworfen, wie z.B. Tumorsuppressor-Gene. Nach Vogelstein et al. (Kinzler and Vogelstein 1996) kommt ein Verlust der Heterozygotie (LOH-loss of heterozygosity) bei ca. 20% der genomischen Sequenzen in colorectalen Carcinomen vor. Dabei kommt es zum Verlust von chromosomalen Sequenzen, die mit einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen einhergehen. Damit ist statistisch die Möglichkeit verringert, DNA-Fragmente zu isolieren, in denen rein zufällige Alterationen während der Tumorgenese stattgefunden haben.

Die Detektion und Isolierung von überrepräsentierten Genomanteilen sollte mit einer vernünftigen Anzahl von Primern möglich sein.

3.4 Ziele der Arbeit

Mit Hilfe der Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) sollte ein Einblick auf DNA Ebene gewonnen werden. Das Anliegen dieser Arbeit bestand in der Erarbeitung und Etablierung einer sensitiven Methode zur Aufdeckung von Unterschieden zwischen DNA von Tumorzellen und von Blutzellen. Diese Unterschiede zwischen den entsprechenden Genomen können qualitative (bezogen auf die Struktur der Chromosome: Deletion und

Amplifikation von Genbereichen) und quantitative (bezogen auf die Aneuploidie: Veränderung des Chromosomensatzes) sein.

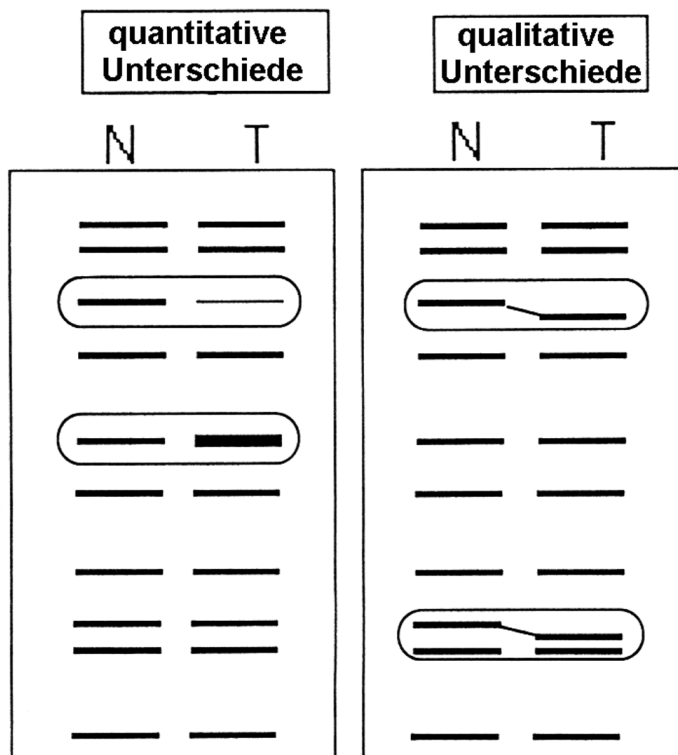


Abb. 2: N und T stehen für die entsprechende RAPD Produkte von DNA aus gesundem und Tumorgewebe. Quantitative Unterschiede machen sich als Intensitätsveränderungen bemerkbar, während qualitative als Positionsveränderungen der Fragmente auf den Gelen zu verstehen sind.

Vor dem Gewebevergleich musste die Optimierung der Methode erfolgen. Unter Optimierung der Methode ist hier die Verstärkung des Signals der einzelnen Amplimere (Fragmente) und die Erweiterung des Bandenspektrums gemeint. Mit der Vergrößerung der Spanne des genetischen Abdrucks, d.h. mit der Produzierung von DNA-Fragmenten, kann ein breiteres Screening des Genoms erfolgen und somit erhöhen sich die Chancen für eine Unterschiedmanifestation. Ein wichtiger Aspekt dieser Vorarbeiten war das Erreichen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Reproduzierbarkeit bezieht sich sowohl auf die hintereinander folgenden Experimente als auch auf die zwischen unterschiedlichen Laboratorien.

Weiteres Ziel war die Charakterisierung der veränderten Genomabschnitte. Diese Unterschiede, als Banden auf den Agarosegelen sichtbar, sollten cloniert, sequenziert und mit den bekannten Genomabschnitten in den Genbanken verglichen werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material und Geräte

4.1.1 *Feste Chemikalien*

Agarose : GIBCO/BRL Life Technologies
Borsäure : Merck
EDTA : Merck
DMSO : Merck
Natriumacetat : Merck
Natriumchlorid : Merck
Natriumhydroxid : Riedel-de-Haën
Trehalose : Sigma
Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethan] : Merck
Betaine : Sigma

4.1.2 *Flüssige Chemikalien*

Aqua ad injectabilia : Braun
Chloroform (reinst) : Merck
2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphate (100 mM) : Pharmacia Biotech
Essigsäure (99,8 %) : Riedel-de-Haën
Ethanol (98 %) : Baker
Ethanol (70 %) : Baker
Formamid : Merck
Isopropanol : Merck
Methanol : Baker
Paraffin-Öl : Sigma
Phenol (in TE äquilibriert; pH 8,0) : Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (37 %) : Merck
Salzsäure (1 M) : Riedel-de-Haën
Triton-X-100 : Merck

4.1.3 *Standardpuffer und Lösungen*

Gelbeladungspuffer (5x)

0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol
15 % Ficoll

TBE-Elektrophoresepuffer (10x)
900 mM Borsäure
900 mM Tris
20 mM EDTA

TE (1x)
10 mM Tris/HCL (pH 8,0)
1 mM EDTA
autoklavieren

PBS
0,85 % (w/v) NaCl
66 mM NaPO₄ (pH 7,0)

autoklavieren

4.1.4 Biochemikalien, Enzyme und Standards

Proteasen:

20 mg/ml Proteinase K, gelöst in 20 mM TE (pH 7,5)

Enzyme

Tabelle1

Kommerzieller Name	Quelle/ Bakterium	Anbieter
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Amersham
Tth DNA Polymerase	Thermus thermophilus	Amersham
Tub DNA Polymerase	Thermus ubiquitous	Amersham
Ampli Taq	Thermus aquaticus	Perkin Elmer
Stoffel Fragment	Thermus aquaticus	Perkin Elmer
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Promega
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Stratagene
Taq Plus DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Stratagene
Pfu	Pyrococcus furiosus	Stratagene
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Takara
Ex Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Takara
LA Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Takara
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Qiagen
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Appligene oncor
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Gibco/ Life Technologies
Goldstar	Unbekannt	Eurogentec
Dap DNA Polymerase	Unbekannt	Eurogentec

(mehrere Enzyme, darunter
eins mit 3' - 5'
proofreading Aktivität)

Kommerzieller Name	Quelle/ Bakterium	Anbieter
Pwo	Pyrococcus woesei	Eurogentec
Replitherm DNA Polymerase	Unbekannt	Epicentre
Tth DNA Polymerase	Thermus thermophilus	Epicentre
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	MBI Fermentas
Tth DNA Polymerase	Thermus thermophilus	MBI Fermentas
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Pharmacia
Tth DNA Polymerase	Thermus thermophilus	Pharmacia
Vent	Thermococcus litoralis	New England Biolabs
Vent exo (ohne 3' - 5' proofreading Aktivität)	Thermococcus litoralis	New England Biolabs
Deep Vent	Pyrococcus spec. (GB - D)	New England Biolabs
Deep Vent exo (ohne 3' - 5' proofreading Aktivität)	Pyrococcus spec. (GB - D)	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Thermus aquaticus	Boehringer Mannheim
Tth DNA Polymerase	Thermus thermophilus	Boehringer Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Thermus aquaticus + Pwo	Boehringer Mannheim
Super Taq Plus (mehrere Enzyme, darunter eins mit 3' - 5' proofreading Aktivität)	Thermus aquaticus Weitere Enzyme unbekannt	Mobitec
Mobitaq (k)	Thermus aquaticus	Mobitec
Invitaq	Thermus aquaticus	Invitek
Klentaq	Thermus aquaticus	Invitek
Combipol Taq DNA Polymerase (mehrere Enzyme mit 3' - 5' proofreading Aktivität)	Thermus aquaticus Weitere Enzyme unbekannt	Invitek

DNA-Längenstandard

1Kb DNA-Leiter von GibcoBRL

100bp DNA-Leiter von GibcoBRL mit einem zusätzlichen 2,96kb Fragment eines mit EcoRI geschnittenen Phagemid Bluescript

Primer

Die Primer wurden von der Firma Biotex GmbH synthetisiert.

4.1.5 Gebrauchsfertige Kits

Qiaquick PCR Purification Kit : Qiagen GmbH

Qiaquick Gel-Extraction Kit : Qiagen GmbH

Qiaamp Blood Kit : Qiagen GmbH

Qiaamp Tissue Kit : Qiagen GmbH

Qiaex II Kit: Qiagen GmbH

Invitex DNA/RNA twin prep Isolierungskit, Invitex GmbH

ABI PRISM Big Dye Sequencing Kit : Perkin Elmer

AlkPhos Direct : Amersham Pharmacia Biotech

4.1.6 Verbrauchsmaterial

Blue Max 15 ml-Tubes : Falcon

Blue Max 50 ml-Tubes : Falcon

Polaroid Pola Pan 52 : Polaroid

Reaktionsgefäße, 1,5 ml : Sarstedt

Reaktionsgefäße, 0,2 ml : Perkin Elmer

Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel, 2,0 ml : Sarstedt

Röntgenfilm, Hyperfilm-MP : Amersham

Save-Lock 0,5 ml Tubes : Eppendorf

Reaktionsgefäße, 0,5 ml : Landgraf

4.1.7 *Humanes Gewebe*

Das frisch eingefrorene Tumorgewebe und das heparinisierte Blut von Mamma-Ca. Patientinnen wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Richter, Pathologisches Institut, Marienstrasse, Hannover, zur Verfügung gestellt.

4.1.8 *Geräte*

Gelaire BSB 3A Sterilbank : Flow Labortechnik GmbH
Gene Power Supply GPS 200/400 : Pharmacia
Heraeus Biofuge A : Heraeus
Heraeus Biofuge 13 : Heraeus
Heraeus Variofuge 20 RS : Heraeus
Horizontalgelelektrophorese System H4 : GIBCO/BRL Life Technologies
Horizontalgelelektrophorese System H5 : GIBCO/BRL Life Technologies
Kodak x Omatic Cassette/Regular Screen : Kodak
Mikrowelle Whirlpool 625 : Philips
Omnilab (Magnetrührer und Heizer) MR 2002 : Heidolph
Pipetman Variopipetten (20, 100, 200, 1000 ml) : Gilson
pH-Meter/portable : Hama Instruments
Power Supply ECPS 3000/150 : Pharmacia
Test Tube Heater SHT 1 : Stuart Scientific
Thermocycler Varius V : Landgraf
Thermocycler 2400 und 9600 : Perkin Elmer
Thermocycler Trio-Thermoblock : Biometra
Thermocycler Crocodile : Appligene
Thermocycler ATAQ Controller : Pharmacia
Thermocycler 100PTC, 150PTC : MJR
Wasserbad : Gesellschaft für Labortechnik
Zeiss Spektralphotometer PMQ 3 : Zeiss
Zentrifuge 3200 : Eppendorf
Sequencer 310 : Perkin Elmer

4.2 METHODEN

4.2.1 *Aufarbeitung von DNA aus EDTA behandeltem Vollblut*

Um aus EDTA behandeltem Vollblut DNA zu Isolieren, wurden hier drei verschiedene Methoden angewandt:

4.2.2 *Proteinase K/Phenol/Chloroform-Methode*

Bei dieser Methode wurden die Zellen lysiert und die Zellkerne der kernhaltigen Blutzellen pelletiert. Es folgte eine Lyse der Kerne und eine Proteinase K-Behandlung. Um die Nukleinsäuren, in erster Linie DNA, rein darzustellen, wurden die Proben einer Phenol/Chloroform Extraktion unterworfen. Die DNA wurde durch eine Ethanolfällung konzentriert. Die DNA-Konzentration wurde durch eine Messung der Optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Spezielle Lösungen:

0,2 M EDTA (pH 7,5)

Lysepuffer:

0,32 M Saccharose

0,1 M Tris/HCl (pH 7,5)

1% (w/v) Triton X-100

STE:

100 mM NaCl

50 mM Tris/HCl (pH 7,5)

1 mM EDTA

10% (w/v) SDS

Es wurden 4 ml Blut intravenös entnommen und mit 400 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) als Antikoagulans versetzt. Das so behandelte Blut wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 36 ml (9 Volumenteile) Lysispuffer zugefügt. Nach dem Verschliessen wurde das Gefäß kräftig geschüttelt.

Es schloss sich eine Inkubation von 15 min. auf Eis an. Nach dieser Zeit wurde die Probe bei 2000 x g und RT für 30 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das zumeist rote Sediment mit 40 ml Lysispuffer gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation unter den zuvor beschriebenen Bedingungen.

Nach dem Abgiessen der Waschlösung wurde das inzwischen klare Sediment in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 5 ml STE-Puffer versetzt. Das Sediment wurde anschliessend in der STE-Lösung mit einer Pipettenspitze zerkleinert und durch Zugabe von 250 μ l 10% (w/v) SDS-Lösung der für die anschliessende Proteinase K Behandlung komplette Reaktionspuffer hergestellt.

Zuletzt wurden der Mischung 25 μ l einer Proteinase K-Lösung mit der Konzentration von 20 mg/ml zugesetzt. Die Probe wurde gut gemischt und über Nacht bei 50 - 55°C inkubiert.

4.2.3 *Phenolextraktion*

Am nächsten Tag wurde die klare Lösung zum Entfernen von Kondenswasser kurz anzentrifugiert. Um die Proteine vollständig abzutrennen, schloss sich dem Verdau durch die Proteinase K eine Phenolextraktion an.

Dazu wurden der nukleinsäurehaltigen Lösung 4 ml in TE-Puffer äquilibriertes Phenol und 4 ml Chloroform zugefügt. Die Probe wurde vorsichtig für 6 min. geschüttelt. Dabei war darauf zu achten, dass es zur Durchmischung der wässrigen und der organischen Phase kam.

Zum Beschleunigen der Phasentrennung wurde die Probe für 10 min. bei RT und 3000 x g zentrifugiert. Die untere, organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette entnommen und verworfen.

Dieser Vorgang wurde zwei weitere Male durchgeführt. Nach der dritten Extraktion wurde die wässrige Phase mit einer 1 ml Pipette, der mit einer sterilen Schere die Pipettenspitze entfernt worden war, in ein frisches 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Hier war besonders darauf zu achten, dass die Interphase, der Bereich zwischen organischer und wässriger Phase, im alten Falcon-Röhrchen verblieb. In diesem Bereich befanden sich viele der durch das Phenol denaturierten Proteine.

Um das Phenol möglichst quantitativ zu entfernen, wurde die wässrige Phase anschliessend zweimal mit 8 ml Chloroform ausgeschüttelt.

4.2.4 Präzipitieren von DNA

Spezielle Lösungen:

3 M Natriumacetat (pH 6,0)

Die wässrige Phase wurde auf eine Natriumacetatkonzentration von 0,2 M eingestellt und mit 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (98%) versetzt. Nach kurzem Mischen präzipitierte die DNA im allgemeinen sofort. Zur Entfernung des Salzes wurde sie in ein Reaktionsgefäss mit 1 ml 70% Ethanol überführt und nach mehrmaligem Schütteln durch Zentrifugation bei 5000 x g für 5 min. sedimentiert. Die Waschflüssigkeit wurde dekantiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Dekantieren wurde das Gefäss erneut für 2 min. bei 5000 x g zentri-fugiert, der Ethanol mit einer Pipette abgenommen und das DNA Sediment an die Wandung des Gefässes gezogen.

Zur Trocknung der DNA wurde das Gefäss für 10 min. geöffnet. Je nach Grösse des DNA-Sedimentes wurde die Probe in 200 - 600 µl TE-Puffer aufgenommen.

4.2.5 Rapid-Methode zur DNA Isolation (Lahiri and Nurnberger 1991)

Spezielle Lösungen:

Puffer TKM1:

10 mM Tris/HCl (pH 7,6)

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

2 mM EDTA

Puffer TKM2:

10 mM Tris/HCl (pH 7,6)

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

0,4 M NaCl

2 mM EDTA

NaCl, gesättigt (konz. > 6 M)

5 ml intravenös entnommenes Blut wurde mit EDTA zur Verhinderung der Gerinnung behandelt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Der Probe wurden 5 ml des Puffers

TKM1 und 125 µl Nonidet P-40 zugegeben. Durch mehrfaches Schwenken wurde die Probe gemischt. Es folgte eine Zentrifugation bei RT und 2000 x g für 30 min.. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet am Boden erneut mit 5 ml TKM1 Puffer gewaschen. Es schloss sich eine Zentrifugation unter den zuvor genannten Bedingungen an. Nach dem Dekantieren wurde das Pellet in 800 µl TKM2 suspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Suspension wurden 50 µl einer 10% SDS-Lösung zugesetzt und die gesamte Mischung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermengt. Es folgte eine Inkubation bei 55°C für 10 min. und anschliessend die Zugabe von 300 µl einer gesättigten Kochsalzlösung.

Nach einer weiteren, kurzen Inkubation wurde die Probe für 5 min. bei 13000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand, der die Nukleinsäuren enthielt, wurde in ein Becherglas überführt. Der Probe wurde nun das zweifache Volumen an 98% Ethanol bei RT zugesetzt. Das Becherglas wurde geschwenkt und die Nukleinsäuren präzipitierten. Anschliessend wurden sie aus dem Glas in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, das 1 ml eiskalten 70% Ethanol enthielt, überführt. In diesem wurden sie durch mehrmaliges Schütteln gewaschen. Anschliessend folgte eine Zentrifugation für 5 min. bei 13000 x g und 4°C. Die DNA wurde nach dem Dekantieren des Ethanols und einer Trocknung von 10 min. an der Luft, in 200 - 600 µl 1x TE-Puffer aufgenommen.

4.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Der gelösten DNA wurden 20 µl entnommen und mit 980 µl Wasser gemischt. Anschliessend wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen das Lösungsmittel, also Wasser, in einem Zeiss-Spektralphotometer bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entsprach ein OD₂₆₀-Wert von 1 einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Die Konzentration der DNA-Probe berechnete sich, unter Berücksichtigung der Verdünnung, wie folgt:

$$E_{260} \times 50 \mu\text{g}/1000 \mu\text{l} \times \text{V.F.} = \text{Konzentration der DNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

(V.F. = Verdünnungsfaktor)

4.2.7 Chelex[®] (Biorad) (Walsh, Metzger et al. 1991)

Chelex ist ein chelatbildendes Harz das eine hohe Aktivität für polyvalente Metallionen aufweist. Das Harz besteht aus Styrene-Divinylbenzene Kopolymere die Iminodiazetationen beinhalten, welche als komplexbildende Gruppen fungieren.

Die DNA-Extraktion aus Vollblut (frisches oder eingefrorenes) mit Chelex erfolgt folgendermassen: 1 ml steriles destilliertes Wasser wird in einem sterilen 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Dazu werden 3 µl Vollblut addiert. Das Gemisch wird für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mehrmals geschüttelt. Das

Eppendorfhütchen wird für 2 Minuten bei 10000–15000 x g zentrifugiert. Der Überstand ausser 20-30 µl wird dekantiert. Dazu werden 5% Chelex addiert bis zu einem Endvolumen von 200 µl. Es erfolgt die Inkubation für 15 - 30 Minuten bei 56°C. Nach 5 - 10 Sekunden Vortexen wird das Eppendorfhütchen in ein Wasserbad mit kochendem Wasser für 8 Minuten inkubiert. Nach erneutem Vortexen steht eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 10000-15000 x g an. Die Lösung ist jetzt für den PCR-Prozess fertig. Nur 5 - 20 µl des Überstandes werden für eine Amplifikation benutzt. Die übrige Lösung wird bei +4°C oder bei -20°C aufbewahrt.

4.2.8 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Barlow 1992)

Lösungen

SE 75 mM NaCl
 25 mM EDTA, PH 7,5

ES 0,5 M EDTA
 0,5 % ^{w/v} N-Lauroylsarkosin, PH 7,5

Proteinase K-Lsg.

Die DNA für PFGE sollte in der Grössenordnung von 20 kb sein. Weil die Anfälligkeit der langen DNA-Moleküle gegenüber Scherkräften gross ist und die Nukleasen, die die DNA degradieren, ubiquitär sind, versucht man, die DNA von den in low-melting Agarose eingebetteten Zellen zu präparieren.

Die Gelgiessformen werden in den Kühlschrank gestellt, um sie auf +4°C zu kühlen.

Die Leukozytensuspension wird in einem Eppendorfgefäss überführt und für 15 Minuten bei +4°C oder Raumtemperatur bei 8000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 400 µl SE resuspendiert. 100 µl davon werden 1:10 mit SE verdünnt und die OD (optische Dichte) wird bei 578nm gegen SE als Leerwert bestimmt. Die restlichen 300 µl Leukozytensuspension werden mit SE auf OD⁵⁷⁸=1,8 eingestellt.

Ein Wasserbad wird auf 42 - 45°C vorgeheizt. 2% (^{w/v}) low-melting Agarose in SE werden in der Mikrowelle aufgekocht bis keine Schlieren mehr sichtbar sind (ca 4 - 5 Minuten). Verkochtes Wasser wird bis zum Ausgangsgemisch wieder aufgefüllt. Im Wasserbad wird die Agarose danach abgekühlt.

Die Lymphozytensuspension wird mit gleichem Volumen flüssiger low-melting Agarose versetzt, mit einer Pasteurpipette gemischt ohne das Luftblasen entstehen und in die Gelgiessformen gegeben. Die Gelgiessformen werden danach für 1 Stunde in den Kühlschrank (+4°C) gestellt.

Die Blöckchen werden mit einem Skalpell und / oder Rührspatel auf eine Petrischale gebracht und gedrittelt oder gesechstelt, je nachdem was für eine DNA-Menge für die Reaktionen eingesetzt werden soll. Die geteilten Blöckchen werden in ein Eppendorfreaktionsgefäss mit vorgelegten 0,8 ml Puffer überführt und 20 µl Proteinase k (C = 20 mg/ml) dazupipettiert. Die Blöckchen werden DNA über Nacht bei 50 - 55 °C im Wasserbad inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Eppendorfgefässe auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Puffer wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen, während die Blöckchen mindestens 3 mal mit TE und mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und anschliessend in TE bei +4°C gelagert werden.

4.2.9 Isolation von Lymphozyten

Spezielle Lösungen:

Lymphozyten-Isolationsmedium:

5,9% (w/v) Ficoll

9% Natriumdiatrizoat

In ein 50 ml Falcon Gefäss wurden 15 ml Lymphozyten-Isolations-medium vorgelegt. 10 ml EDTA behandeltes Vollblut wurden mit 10 ml PBS gemischt. Dieses wurde nun vorsichtig mit einer Kanüle auf das Isolationsmedium gegeben. Es war darauf zu achten, dass es nicht zu einer Durchmischung der Schichten kam. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 600 x g für 20 min. bei Raumtemperatur an. Der Rotor musste nach diesen 20 min. ohne Bremse auslaufen, damit eine Verwirbelung der Grenzschicht verhindert wurde.

Danach wurden mit einer Pasteurpipette die Lymphozyten, die sich als scharfe gelblich gefärbte Bande über dem Ficollkissen erkennen liessen, entnommen. Die Zellen wurden in frischen 50 ml Falcon-Röhrchen aufgenommen und mit 20 ml PBS durchmischt. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation von 10 min. bei 400 x g an. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und der Waschschrift wiederholt.

Schliesslich wurden die Zellen in 1 ml PBS suspendiert und auf vier 1,5 ml Reaktionsgefässe verteilt. Die Proben wurden erneut bei 400xg für 10 min. zentrifugiert, das Lösungsmittel dekantiert und das Zellsediment in 250 µl GIT-Puffer aufgenommen.

4.2.10 Aufarbeitung von DNA aus Vollblut und Gewebe

Um DNA-Sequenzen aus venösem Blut und Tumorgewebe zu vergleichen, mussten aus diesen DNA isoliert werden. Dies erfolgte mit den kommerziell erhältlichen Qiaamp Blood and Tissue Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

4.2.11 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der spezifischen Vermehrung von DNA Abschnitten, d.h. sie ist praktisch eine in vitro Klonierung. Die Abschnitte müssen sich zwischen zwei bekannten Sequenzbereichen befinden. An diese lagern sich die synthetisch hergestellten Oligonukleotide als Startmoleküle (Primer) für die eingesetzte Polymerase, an. Da dieses nur bei denaturierter, also einzelsträngiger DNA möglich ist, müssen die DNA-Stränge der Vorlage (Template) im ersten Schritt dieser Reaktion durch Erhöhung der Temperatur auf 94°C separiert werden.

Im nächsten Schritt findet die Anlagerung der Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA statt. Dieses wird erreicht, indem der Reaktionsansatz schnell auf die, für die verwendeten Oligonukleotide gemeinsame, Anlagerungstemperatur abgekühlt wird.

Die Synthese der DNA-Abschnitte erfolgt nach Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 72°C. Durch eine erneute Temperaturerhöhung auf 94°C werden die synthetisierten DNA-Stränge wiederum getrennt und ein weiterer Reaktionszyklus beginnt.

In diesem zweiten Zyklus kann der neu synthetisierte DNA-Abschnitt ebenfalls als kopierbares Template dienen. Die Anzahl der kopierbaren DNA-Moleküle hat sich nach dem ersten Zyklus (bei 100%iger Effizienz) verdoppelt.

Im folgenden dritten Reaktionszyklus entstehen die ersten längendefinierten DNA-Fragmente.

Da ihre Vermehrung im Idealfall exponentiell verläuft, erhält man nach 30 - 40 Reaktionszyklen in einer nachfolgenden gelelektrophoretischen Analyse eine Fragmentbande, mit einer vorhersagbaren Länge. Durch die Etablierung von hitzebeständigen Polymerasen konnte diese Methode automatisiert werden.

4.2.12 Durchführung der Polymerasekettenreaktion

Die PCR Mischung wurde auf das Gesamtvolumen von 25 oder 50 µl aufgefüllt und abschliessend mit drei Tropfen Paraffinöl überschichtet.

Sollten viele PCR-Ansätze mit gleichen Primern, aber verschiedenen DNA-Proben bearbeitet werden, wurde ein sogenannter „Mastermix“ pipettiert. Er enthielt ein durch die Anzahl der verschiedenen DNA-Proben resultierendes Vielfaches eines Einzelansatzes.

Die jeweiligen Konzentrationen der Reagentien sowie die Temperaturprofile der PCR Reaktionen werden unter Kapitel 3 (Resultate) angegeben.

Am Ende wurde der letzte Programmschritt, die Kettenverlängerung, auf 600 Sek. bei 72°C verlängert. Abschliessend erfolgte eine langsame Abkühlung auf 15°C. Bei dieser Temperatur verblieb der Ansatz, da die PCR zumeist über Nacht erfolgte.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit, d.h. in der Optimierung der Methode wurden 2 Primer benutzt : SPAP5(TCA CGC TGC G) und SP3(TGC TCA GTC GAT).

4.2.13 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Fragmenten erfolgte in einem 2,0%igen (w/v) Agarosegel in einer Horizontalelektrophorese. Je nach Gelgrösse und gewünschter Agarosekonzentration wurde die notwendige Menge des Agarosepulvers in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und das entsprechende Volumen an 1x TBE-Puffer hinzugefügt. Um die Agarose in Lösung zu bringen, musste der Gelansatz in der Mikrowelle mehrmals aufgeköcht werden. Der heissen Gellösung wurde so viel Ethidiumbromidlösung ($c = 2,5 \text{ mg/ml}$) zugefügt, dass die Konzentration im Gel 0,5 mg/ml betrug. Die gewünschte Gelform wird an den offenen Seiten mit Klebeband verschlossen und je nach gewünschter Trennstrecke ein oder zwei Taschenformer (auch als „Kämme“ bezeichnet) in der Gelform plaziert. Mit einer Wasserwaage wurde die Form ausgerichtet. Die etwas erkaltete Agaroselösung wurde in die vorbereitete Gelform gegossen. Kleinere Luftblasen, die beim Giessvorgang entstanden waren, wurden mit einer Kanüle an den Gelrand gezogen.

Nach dem Erkalten wurden das Klebeband und die Kämme entfernt. Das angefertigte Agarosegel wurde in die Elektrophoreseapparatur gelegt. Diese wurde so mit 1x TBE-Puffer gefüllt, dass das Gel komplett bedeckt war. Die zu applizierenden Proben wurden mit 5x Gelbeladungspuffer versetzt, so dass eine einfache Pufferkonzentration resultierte. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde die Probe gemixt und in die geformten Taschen des Gels gefüllt. Das aufgetragene Probenvolumen lag bei etwa 13 µl. Um die Länge der Fragmente abzuschätzen, erfolgte der Auftrag eines Längenstandards.

Während der Elektrophorese war anhand der Farbstoffe Bromphenolblau des Gelbeladungspuffers die zurückgelegte Strecke zu beobachten. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 V für 4 - 5 h, je nach gewünschter Trennstrecke, durchgeführt.

4.2.14 Analyse des Gels

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht einer Wellenlänge von 302 nm auf einem Transilluminator betrachtet. Zur Dokumentation wurde das Gel mit einer Sofortbildkamera (Belichtung: 8 sec. bei Blende 4,5 und einer Filmempfindlichkeit von 400 ASA) durch einen Gelbfilter fotografiert. Zusätzlich wurde das Fotodokumentationssystem "Eagle Eye" von Stratagene benutzt.

4.2.15 Klonierung und Sequenzierung der Fragmente

Nach der Photodokumentation erfolgte unter kurzer UV-Belichtung und mithilfe eines Skalpels die Exzision eines TBE Gelstücks, das die gewünschte DNA Banden enthält. Die Isolierung der DNA aus der Agarosematrix erfolgt mit dem Qiagen QIAEX II Kit nach den Anweisungen des Anbieters. Die eluierten DNA Fragmente wurden erneut amplifiziert. Diese zweite PCR wurde mit den selben Primer durchgeführt wie die erste und erstreckte sich über 35 Zyklen. Alle Reagentien hatten die gleichen Konzentrationen wie in der ersten Reaktion. Es folgte die erneute Trennung der PCR Produkte auf Agarosegelen und die Wiederholung der Fragmentisolierung.

Für die Klonierung der RAPD Banden wurde der pGEM-T Vektor von Promega benutzt. Die Transformation der DH5a E.coli Bakterien mittels Elektroporation, die Kultivierung der Bakterien und insgesamt die Klonierung der RAPD Fragmente, wurde wie bei Sambrook et al. durchgeführt. Die Plasmid DNA wurde aus den Kulturen mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit isoliert und danach durch Restriktionsverdau auf das Vorhandensein von Insertionen überprüft. Die Sequenzierung der Plasmid DNA wurde mittels cycle sequencing und dem ABI Prism Big Dye Sequenzierungskit von Perkin Elmer durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion fand in einem Perkin Elmer PCR Thermocycler 2400 statt und setzte sich aus 30 Zyklen mit folgendem Profil zusammen: 96°C für 10 Sek., 45°C für 5 Sek. und 60°C für 4 Min.. Die entstandenen Produkte wurden mit dem Sequencer 310 von Perkin Elmer analysiert. Zur Sequenzierung wurden synthetische Oligonukleotide verwendet. Die gewonnenen Sequenzen wurden mit dem Programm Sequencher 3.0 von Gene Codes Corporation bearbeitet.

4.2.16 DNA Analyse

Für die weitere DNA Analyse, also dem PCR-Blot, wurden die RAPD Produkte auf einem 2% Agarose Gel aufgetrennt. Zum Depurinisieren wurde das Gel für 20 min in 0,25M HCl inkubiert. Anschließend wurde das Gel für je 20 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5M Tris HCl pH 7,5) und in 20 x SSC geschwenkt. Im Anschluß daran wurde die DNA durch Kapillartransfer mit 20 x SSC auf einen Nylonfilter übertragen. Die Fixierung der DNA an die Membran erfolgte durch Inkubation der Filter für 2 Stunden bei 85°C. Als Labelling Kit wurde das AlkPhos Direct von Amersham Pharmacia Biotech benutzt und die Hybridisierung erfolgte nach den Empfehlungen des Anbieters.

4.2.17 CAA(Chloracetaldehyd)

Die auf 50 mM Natriumazetat eingestellten PCR-Produkte werden mit steigenden CAA-Konzentrationen (0, 4, 6, 8, 10, 20 mM) versetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proben wie im 3.11. beschrieben 2 % Agarosegel aufgetragen und für 4 Stunden bei einer Spannung von 80 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.

5 RESULTATE

Die ersten Versuche wurden mit folgendem Profil durchgeführt: 50 Zyklen, die sich aus der Denaturierung bei 94°C für 45 Sek., der Primeranlagerung bei 35°C für 60 Sek., einem Übergang von 420 Sek. zwischen Anlagerungs- und Extensionstemperatur und Polymerisation bei 72°C für 120 Sek. zusammensetzten. Jeder Primer hatte eine finale Konzentration von 0,5 µM und jedes Desoxyribonucleotid 0,2 mM. Die Reaktionen wurden in 4 mM MgCl₂, 50 mM KCl und 10 mM Tris-HCl PH 8,3 durchgeführt mit 80 ng DNA, die durch die Phenol/Chloroform/Proteinase K Methode isoliert wurde.

5.1 Zyklenanzahl

Durch Veränderung der Anzahl der Zyklen der PCR wurde beobachtet, dass unter den oben genannten Konditionen nach 25 Zyklen alle Banden in geringeren Mengen produziert wurden, während mit 30 Zyklen nur die Intensität einiger Banden geringer war. Eine ausreichende Amplifikation war mit 35 Zyklen gegeben. Durch zusätzliche Zyklen wuchs auch die Intensität eines Schmiere. Weiter wurde beobachtet, dass ein ekzessives Benutzen von Zyklen z.B. bis zu 80 Zyklen keine Anwesenheit zusätzlicher Banden im Bereich 0-4 Kb als Folge hatte.

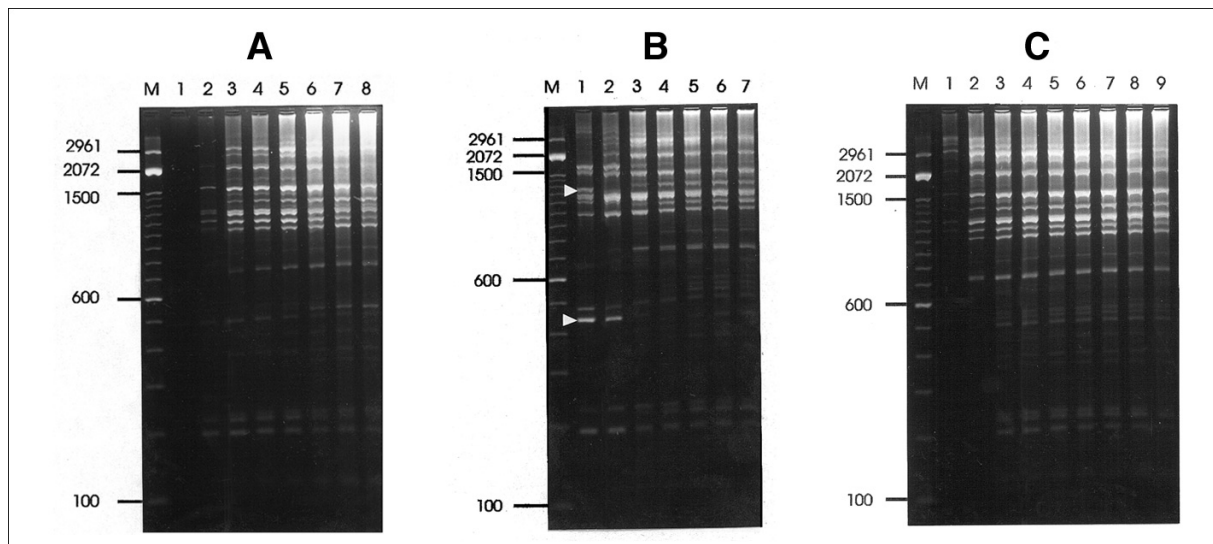


Abb. 3:

Photo A zeigt die Variierung der Taq DNA Polymerase Konzentration. Reihen 1–8: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 5, 7,5 und 10U. Bei 5, 7,5 und 10U entwickelte sich massiver Schmier.

Photo B demonstriert die Variierung der $MgCl_2$ Konzentration. Reihen 1–7: 1,5, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 mM. Die zwei Pfeile in der 1. Reihe machen auf 2 Banden ca. 450 bp und 3 kb aufmerksam, die bei Konzentrationen von 4 mM und höher nicht mehr present waren.

Photo C dokumentiert die Variierung der AnzahlZyklenanzahl. Reihen 1– 9: 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 und 80 Zyklen.

25 Zyklen produzierten alle Fragmente in geringer Menge, während 30 Zyklen eine schwache Amplifizierung von Banden unter 600 bp zeigten. Mit steigender Zyklenanzahl vermehrte sich auch der Schmier.

5.2 DNA Konzentration

Um die optimale DNA Konzentration zu ermitteln, d.h. die geringste Menge die zu reproduzierbaren Ergebnissen führt, wurden Versuche durchgeführt in denen sich die DNA Konzentration sich über ein grosses Spektrum erstreckte: von 0,01 ng bis 5 μ g in einem 50 μ l PCR-Ansatz. Zusätzlich wurde DNA aus unterschiedlichen Isolierungen, die mit der selben Methode (Phenol/Chloroform/Proteinase K) von der selben Person und am selben Tag

präpariert wurde, getestet. Die Konzentrationen von 50 ng bis 500 ng ergaben für alle DNA Isolate reproduzierbare Ergebnisse. Die erste DNA Konzentration, die zu sichtbaren 1 bis 2 Kb Fragmente führte, war 0,1 ng. Mit 1 ng DNA wurden mehr Produkte registriert, wie auch Unterschiede im niedermolekularen Bereich (400 bp bis 1 Kb). Grössere DNA Quantitäten (1,3 und 5 µg) schwächten die hochmolekularen Banden (~3 Kb) und favorisierten ein Fragment von ca 450 bp. Wie aus der Abb.2 zu entnehmen ist, nahm das Bandenmuster des B Isolats im hochmolekularen Bereich schneller an Intensität ab, als das entsprechende des A Isolats.

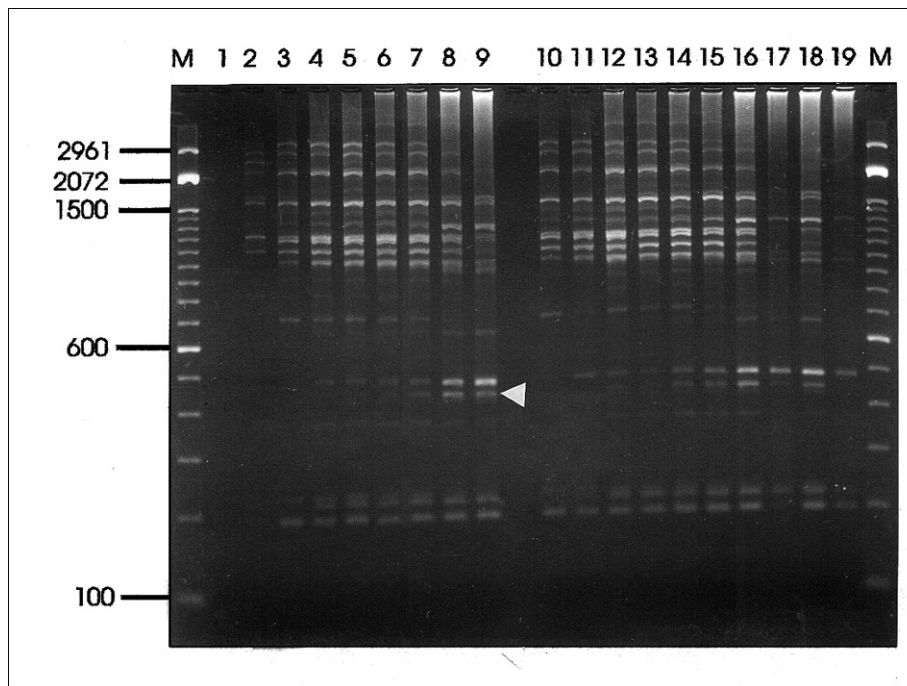


Abb. 4:

Die Reihen 1–9 zeigen die Variation der DNA Konzentration (Lösung A). Sie entsprechen 0,01 ng, 01 ng, 1 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng, 1 μ g, 3 μ g und 5 μ g. Der Pfeil markiert eine Bande ca. 450 bp die bei 1 μ g, 3 μ g und 5 μ g sichtbar wurde. Muster die mit 50 ng, 100 ng und 500 ng produziert wurden, waren identisch. Die Reihen 10-19 zeigen Muster die mit DNA der Lösungen A und B abwechselnd produziert wurden. Die Reihen 10 und 11 entsprechen 1ng, 12 und 13 entsprechen 100 ng, 14 und 15 entsprechen 1 μ g, 16 und 17 entsprechen 3 μ g, 18 und 19 entsprechen 5 μ g. Das Photo zeigt, dass bei höheren Konzentrationen (3 μ g und 5 μ g) die von der Lösung B produzierten Muster schneller an Intensität abnehmen.

5.3 DNA Isolierungsmethode

Grosse Aufmerksamkeit wurde der DNA Extraktionsmethoden und der DNA Qualität gewidmet. Auf Grund von Beobachtungen, dass Heparin die PCR inhibiert, wurde EDTA-Blut als Ausgangsmaterial für die DNA Isolierung benutzt. Die DNA wurde aus peripheren Leukozyten der gleichen Person mittels 5 unterschiedlichen Methoden isoliert: mit der Chloroform/Phenol/Proteinase K, der Aussalzungsmethode, mit dem Chelat-bildendem Chelex^R Harz, der DNA Isolierungsmethode für PFGE (Pulsed Field Gel Elektrophoresis) mit dem Qiagen DNA Isolierungskit und den Invitak Kit. Jede Methode wurde 3-fach an darauffolgenden Tagen angewendet, um die Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit zu untersuchen. Alle Isolierungsarten haben zuverlässige Resultate ergeben mit Ausnahme der des Chelat-bildenden Harz Chelex benutzt. Der Versuch diese "rohe" Methode mit der Benutzung von Proteinase K in dem Inkubationsschritt zu verfeinern, hat sich nicht als erfolgreich herausgestellt. Ausserdem wurde versucht, ein RAPD Muster zu bekommen, in dem man 0,5 µl oder 1 µl Vollblut pro 50 µl PCR Volumen amplifiziert hat. Die Vorbehandlung des Blutes bestand in 20 Temperatur-Zyklen zwischen 90°C und 50°C mit einer Verbleibsdauer von 1 Minute bei jeder Temperatur (Burckhardt 1994). Diese Amplifizierung produzierte nur die niedermolekularen Banden. Ausserdem waren 50 Zyklen ergiebiger als 35.

5.4 Mischung von humaner mit humaner DNA und humaner mit bakterieller DNA.

Eines der grössten Probleme der PCR Methode besteht in der Kontamination des DNA Templates. Die Beimischung von fremder DNA kann zur Produktion von zusätzlichen unspezifischen Banden und zur erniedrigten Ausbeute des gewünschten Fragments führen. Um den Einfluss der Kontamination auf das RAPD Bandenmuster zu untersuchen wurden zwei Experimente durchgeführt.

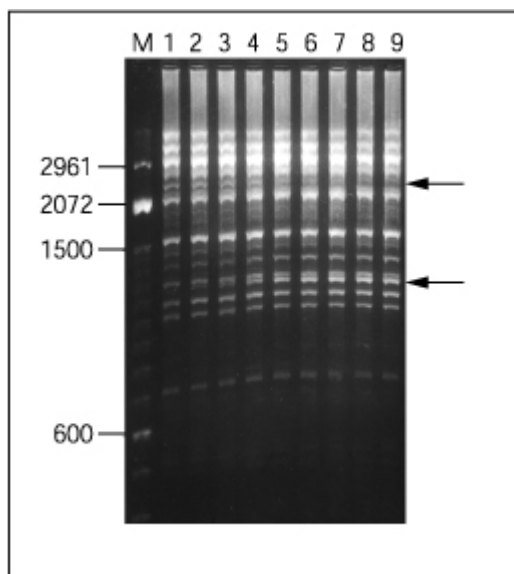


Abb. 5:

Mischung der DNA zweier Personen, A und B (in dieser Reihenfolge in ng angegeben): (1) 80 von A, (2) 75 und 5, (3) 70 und 10, (4) 40 und 20, (5) 40 und 40, (6) 20 und 60, (7) 10 und 70, (8) 5 und 75, (9) 80 von B. Die beiden Pfeile weisen auf die Banden deren Intensität ab- und zunimmt.

Als erstes wurde die DNA zweier Individuen in unterschiedlichen Mengen zusammengemischt, so dass die DNA Konzentration in den PCR Hütchen immer 80 ng betrug. Die Fragmentmuster unterschieden sich in zwei Regionen. Eine ca 2,2 Kb Bande nahm an Intensität ab, während eine ca 1,3 Kb, die nur bei einer Person vorkam, zunahm. Erwähnenswert ist, dass 5-10 ng der zusätzlichen DNA ausreichend sind, um eine neue Bande zu produzieren.

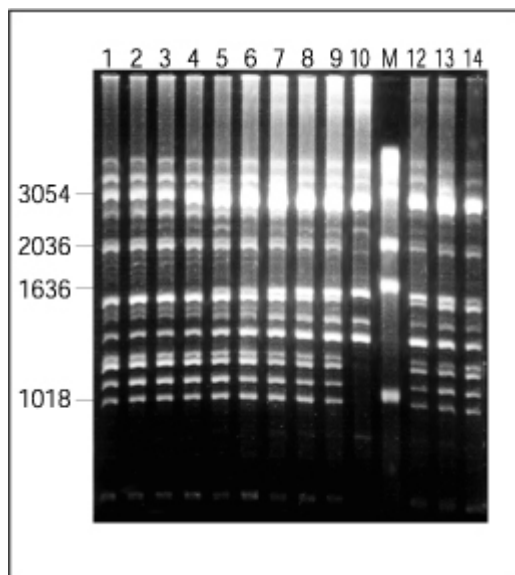


Abb. 6:

Mischung menschlicher und bakterieller (*Neisseria meningitidis*) DNA (in dieser Reihenfolge in ng angegeben): (1) 80, (2) 80 und 0,02, (3) 80 und 0,2, (4) 80 und 2, (5) 80 und 10, (6) 80 und 20, (7) 80 und 60, (8) 80 und 100, (9) 80 und 200, (10) 200, Marker, (12) 20 und 60, (13) 40 und 40, (14) 60 und 20. In der (5) werden zum ersten mal 3 Banden intensiver, die charakteristisch für die bakterielle DNA sind: eine ca. 3000bp, eine ca. 2400bp und eine ca. 1600bp.

Der zweite Test bestand in der Zugabe von steigender *Neisseria meningitidis* DNA Menge zu 80 ng humaner DNA. Die Bandenmuster zeigten, dass der Umschlagpunkt, d.h. die erste Produktion von Banden durch Bakterien, mit 10 ng erreicht wurde, und dass diese Unterschiede sich mit steigender Menge an addierter DNA verstärkt haben.

5.5 Mg⁺² -, Primer - und KCl Konzentrationen

Eines der Elemente, die für die Stringenz der PCR Reaktion verantwortlich sind, ist die Mg⁺² Konzentration, die so niedrig wie möglich sein sollte, um unspezifische Anlagerung zu vermeiden. Eine Serie mit unterschiedlichen Magnesium Konzentrationen konnte zeigen, dass 4 mM Mg⁺² oder höher konstante Bandenmuster produzierte, obwohl die hochmolekularen Fragmente bei 10 mM und 12 mM weniger intensiv waren. Im Gegensatz dazu produzierten 1,5 mM und 2 mM zusätzliche Amplimere ca 450 bp und 3 Kb lang, während andere, die bei 4 mM auftraten, wieder verschwanden.

Als nächstes Reagens wurde die Primer Konzentration verändert. Die Konzentration beider benutzter Primer wurde gleichzeitig von 0,5 µM auf 0,25 µM, 0,75 µM und 1 µM erniedrigt oder entsprechend erhöht. Beobachtet wurde, dass alle Muster sich identisch darstellten, jedoch bei einer Konzentration von 0,25 µM divergierten. Hier gewann die grösste Bande leicht an Intensität während die kleinste verschwand. Danach wurde die Konzentration nur des einen Primers von 0,5 µM auf 0,2 µM, 0,4 µM, 0,6 µM und 0,8 µM variiert, während die des anderen Primers konstant bei 0,5 µM bei behalten wurde. Die meisten Banden hatten sich mit Ausnahme mancher schwächeren in der Intensität und Lage nicht verändert. Zu erwähnen ist eine 1,2 Kb Bande, die nur detektierbar war, wenn die SPAP5 Konzentration höher war als die vom SP3 Primer. Die Konzentration der einzelnen Desoxymononucleotiden betrug 0,2 mM im anfänglichen Protokoll. Durch Veränderung ihrer Konzentration und das Beibehalten der anderen Parameter konnte gezeigt werden, dass bei 0,3 mM das gleiche, bei 0,1 mM ein weniger intensives und bei 0,4 mM ein verändertes Bandenmuster ist als mit 0,2 mM produziert wurde.

Durch Variation der Puffermenge wurde die Standard KCl Konzentration von 50 mM um 10%, 20 % und 60 % erniedrigt und erhöht. Die Veränderungen um 10% und 20 % in beiden Richtungen hatten keinen Einfluss auf das Muster. Niedrigere KCl Konzentration um 60 % produzierten nur zwei schwache Banden und einen Schmier.

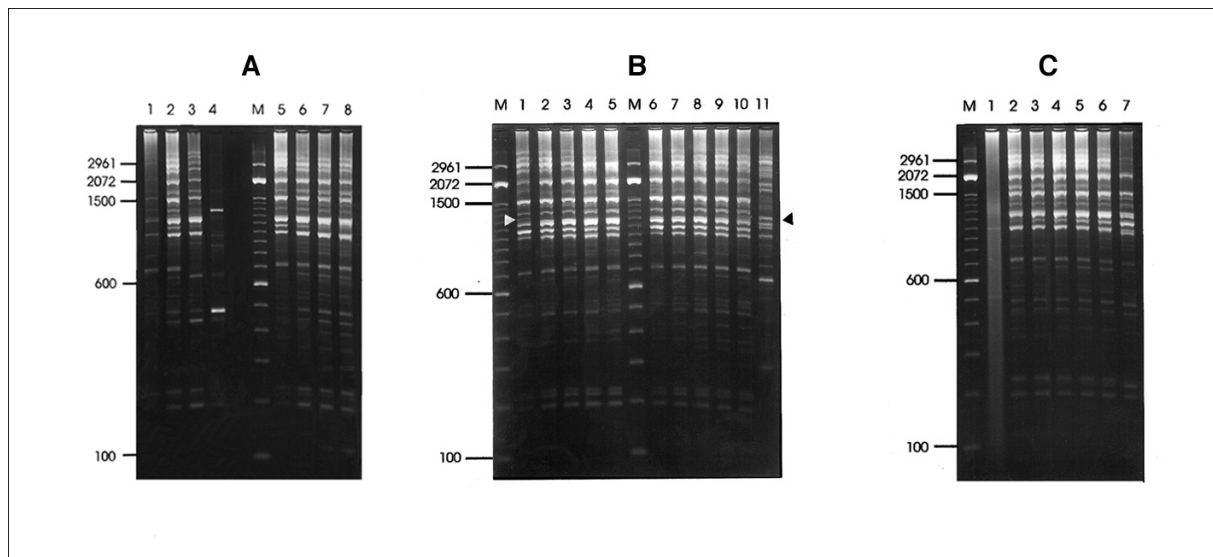


Abb.: 7:

Auf dem Photo A wird auf den Reihen 1–4 die Variation der Deoxyribonukleotidkonzentrationen: 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM und 0,4 mM demonstriert. Die Reihen 5–8 zeigen eine Variation der Konzentration beider Primer: 0,25 μ M, 0,5 μ M, 0,75 μ M und 1 μ M respective.

Auf dem Photo B, die Reihen 1–5 zeigen die Produkte von Reaktionen wo die SP3 Konzentration variiert wurde (0,2 μ M, 0,4 μ M, 0,5 μ M, 0,6 μ M, 0,8 μ M) während SPAP 5 konstant blieb (0,5 μ M). In den Reihen 6–10 war SP3 konstant (0,5 μ M) während SPAP5 variierte (0,2 μ M, 0,4 μ M, 0,5 μ M, 0,6 μ M und 0,8 μ M). Der weiße Pfeil zeigt auf eine 1,2 kb Bande die generiert wurde, als die SPAP5 Konzentration höher war als die von SP3. Die Bande ist anwesend in den Reihen 1, 9 und 10. Die Reihe 11 representiert ein Muster das nach alleiniger Amplifizierung der DNA mit SPAP5 produziert wird. Der schwarze Pfeil zeigt auf ein Fragment das ein ähnliches Molekulargewicht mit der 1,2 kb Bande aufweist.

Photo C: Die Reihen 1–7 demonstrieren Produkte von Reaktionen wo die KCl Konzentration variiert wurde: 20mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM und 80 mM.

5.6 PCR Additiva

Bestimme Additiva, die häufig bei der klassischen PCR benutzt werden, um die Amplifizierung zu erleichtern, wurden ebenfalls getestet, um einen eventuellen Einfluss auf die RAPD festzustellen. Es wurde auch besonders darauf geachtet, ob diese Zusatzstoffe die Intensität der niedermolekularen Banden (unter 1Kb) verstärken. DMSO (Chester and

Marshak 1993), welches die T_m (melting Temperatur) der Primer und die Separierungstemperatur der Stränge erniedrigt sowie die Amplifizierung der DNA mit komplexer sekundärer Struktur fördert, wurde in den Konzentrationen 2,5%, 5% und 10% benutzt, ohne dass das übliche Muster verändert wurde.

Formamid (Sarkar, Kapelner et al. 1990), das Anwendung bei der Amplifizierung von GC(Guanosin-Cytosin)-reichen Sequenzen findet, inhibierte bei Konzentrationen von 1,5 % bis 10 % die PCR. Den gleichen Effekt hatte auch die Zugabe von Glycerol(Varadaraj and Skinner 1994) in das PCR-Reaktionsvolumen mit finalen Konzentrationen 2,5 - 10 %. Auch die gemeinsame Benutzung von Formamid und Glycerol war für die PCR hinderlich.

Zwei weitere Substanzen die getestet wurden, waren N,N,N-trimethylglyzin, Betaine genannt, und das Disaccharid Trehalose (Weissensteiner and Lanchbury 1996). Betaine vereinfacht die Amplifikation von GC-reichen Regionen (Baskaran, Kandpal et al. 1996), in dem es die Unterschiede in der Stabilität der AT- und GC-reichen DNA Regionen verringert und so die melting Temperatur auf einen gemeinsamen Wert bringt (Rees 1993). Das Resultat ist, dass die Formation von sekundären Strukturen reduziert wird (Henke, Herdel et al. 1997). Es wurde eine Serie von Amplifikationen vorgenommen, wobei Betaine finale Konzentrationen zwischen 0,5 Molar bis 3 Molar erreichte. Betaine hatte das gesamte Muster auf eine Bande ca 500 bp reduziert. (Es ist das Bandenmuster einer Amplifikation zu sehen, wobei die Konzentration von Betaine 2,5 M betrug).

Das Disaccharid Trehalose befähigt die Polymerasen ihre normale Aktivität aufrecht zu erhalten (Thermostabilisierung) oder sogar bei höheren Temperaturen noch zu steigern (Thermoaktivierung) bei denen sie eigentlich schon inaktiv sind (Carninci, Nishiyama et al. 1998). Bei der RAPD hat die Benutzung von Trehalose (finale Konzentration 10 %) das Bandenmuster jedoch mit Ausnahme einer ca. 1,2kb langen Bande, die an Intensität zunahm, nicht verändert.

5.7 Heisser Start (Hot Start)

Viele Autoren benutzen den "heissen Anfang" in ihrem Protokoll, um die unerwünschte Anlagerung und darauffolgende Amplifikation von unspezifischen Produkten zu verhindern (Mullis 1991).

Der "heisse Start" besteht in der Erwärmung der PCR Mixtur, die alle Reagentien bis auf eines beinhaltet, für 30 Sek. bei 94°C. Danach wird die Temperatur auf 80°C gesenkt und das fehlende Reagenz, in diesem Falle das Enzym, dazugegeben. Nach 50 darauffolgenden PCR Zyklen konnten keine Unterschiede registriert werden.

5.8 PAD

Eine der Ursachen einer misslungenen PCR-Reaktion könnte die inkomplette Denaturierung des Templates oder der PCR Produkte sein. Aus diesem Grunde wird häufig vor der eigentlichen Reaktion ein zusätzliches Denaturierungsintervall vorgeschaltet, das auch als PAD (Pre-Amplification Denaturation) bekannt ist (D'Aquila, Bechtel et al. 1991). Meistens dauert es 1 bis 7 Minuten und wird bei 90°C bis 94°C durchgeführt.

Um die Nutzbarkeit dieses Schrittes zu untersuchen, wurden 2 Versuche angesetzt. Während in beiden die PCR Mixturen für 0, 1, 3, 5 und 7 Minuten vorgeheizt wurden, wurde beim ersten das Enzym vor und beim zweiten das Enzym danach hinzugegeben. Nach der Amplifizierung, die aus 50 Zyklen bestand, konnte auch hier keine Unterschiede festgestellt werden.

5.9 Denaturierungstemperatur und Übergang zur Anlagerungstemperatur

Die Variierung der Denaturierungstemperatur zeigte, dass 98 °C zu keiner Amplifizierung führten und dass von 90°C abwärts die Bandenzahl abnahm, bis nur noch ein Fragment bei 80 °C produziert wurde. Die Muster bei 96 °C, 94 °C und 92 °C waren fast identisch mit Ausnahme eines Amplimers von ca 1,2 Kb, das bei 96 °C intensiver erschien. Dieses bestimmte Fragment trat auf und verschwand, aber bei der Variierung der Denaturierungszeit konnte gezeigt werden, dass eine Verlängerung dieser Reaktionsstufe von 45 Sek. auf 60 Sek. genug war, um seine Präsenz zu sichern. Eine Dauer von 15 Sek. minderte die Intensität mancher PCR Produkte während 90 Sek. keinen weiteren Einfluss hatten. In der Standard-PCR sollte der schnellst mögliche Übergang zwischen Denaturierungstemperatur und Anlagerungstemperatur gewählt werden, um die Renaturierung des Template DNA und das unspezifische Anlagern der Primer zu verhindern. Experimente mit Veränderung der Übergangszeit vom Denaturierungsschritt bis zum Anlagerungsschritt zeigten, dass auch sehr lange Transitionen (bis zu 420 Sek.) das Fragmentmuster nicht verändern.

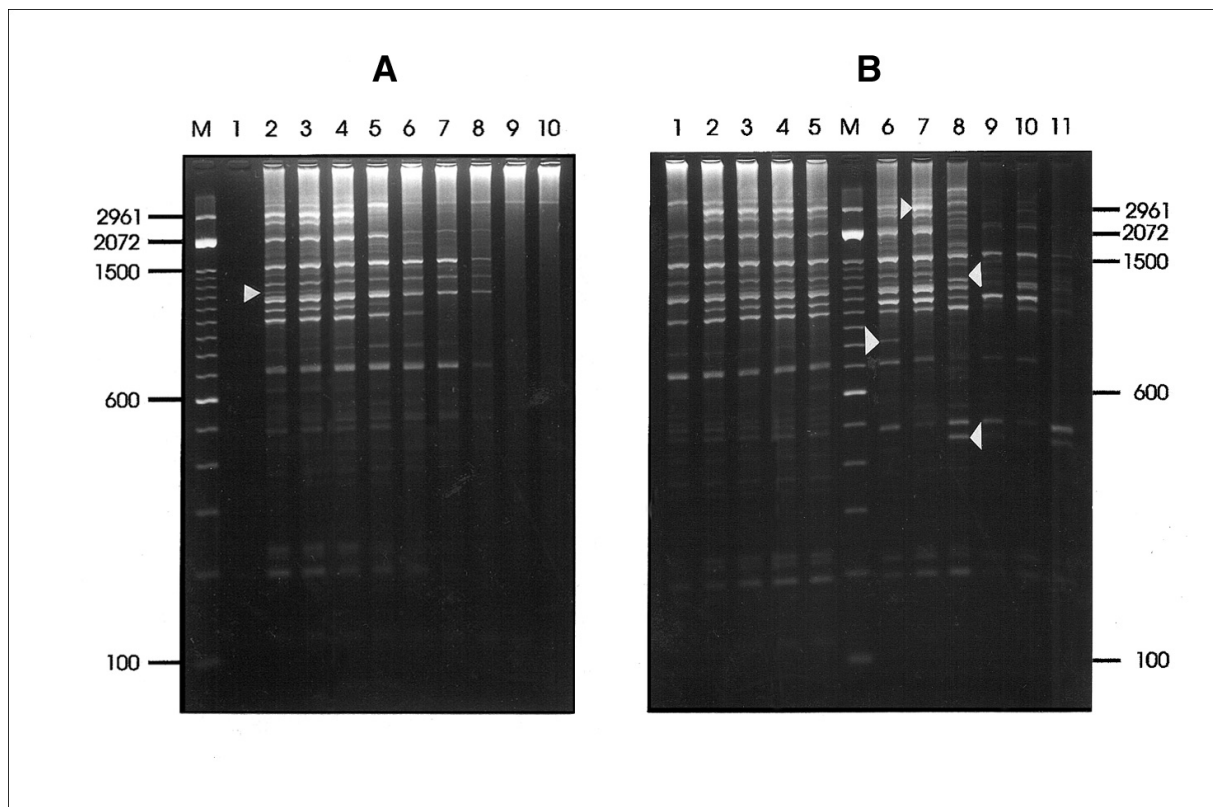


Abb. 8:

Photo A zeigt die Variierung der Denaturierungstemperaturen. Die Reihen 1–10 entsprechen 98, 96, 94, 92, 90, 88, 86, 84, 82 und 80 °C. Der Pfeill zeigt die auf eine ca. 1,2 kb Bande, dessen Presenz erst einheitlich war als die Denaturierung bei höheren Temperaturen (96 °C) stattfand oder als sie verlängert wurde. (60 Sek. und 90 Sek. anstatt 45 Sek., wie im Photo B gezeigt wird).

Im Photo B demonstrieren die ersten 5 Reihen die Variation der Denaturierungszeit (15 Sek., 30 Sek., 45 Sek., 60 Sek. und 90 Sek.) bei 94 °C. Die Reihen 6 und 9, 7 und 10, 8 und 11 zeigen die Muster die bei Anlagetemperaturen von 15°C, 35°C und 45°C entsprechend gewonnen wurden. Die Reaktionen der Reihe 6, 7 und 8 wurden mit Rampe und die Reaktionen der Reihen 9, 10, und 11 ohne Rampe durchgeführt. Die Pfeile zeigen die Hauptdifferenzen. In Linie 6 eine Bande ca. 800 bp und in Linie 7 eine Bande ca. 3 kb. In Linie 8 die Pfeile markieren eine ca. 450 bp Bande und eine in der Region um die 1,2 kb.

5.10 Anlagerungstemperatur

Die Stringenz einer PCR Reaktion hängt, wie schon erwähnt, von der Mg^{+2} Konzentration und der Anlagerungstemperatur ab, die im Falle der RAPD niedrig sein sollte. Um den Einfluss der Anlagerungstemperatur auf die PCR Reaktion zu untersuchen, wurden Programme verwendet, in denen die Anlagerungstemperatur Werte so gewählt wurde, dass sie sich durch 2°C Addition oder Subtraktion von einem Ausgangspunkt bei 35 °C unterschied. Die Übergangsdauer zwischen Anlagerungs- und Polymerisationstemperatur wurde immer entsprechend angepasst, so dass der Temperaturgradient 1°C pro 11 Sek. betrug. Die Daten zeigten, dass 47°C die obere Grenze des Bereiches darstellte, in dem noch eine Anlagerung stattfand. Um die Unterschiede zu Demonstrieren, wurden aus der breiten Spanne zwischen 15°C bis 47°C drei representative Temperaturen ausgesucht; 15°C, 35°C und 43°C. Die Muster, die bei 15°C und 35°C gewonnen wurden, waren fast identisch mit zwei kleinen Differenzen: bei 35°C zeigte sich eine intensivere Bande bei ca 3 kb, aber verschwand eine kleinere bei ca 800 bp.

Bei 43°C wurde eine zusätzliche Bande bei 450 bp sichtbar, eine vorher schwache nahm an Intensität zu (~1,2 Kb) und eine Doppelbande verschwand (~1,3 Kb).

Als längere Anlagerungszeiten, bis zu 11 Sek., gefolgt von den schnellst möglichen Überleitungen in den Programmen benutzt wurden, konnte die grösste Anzahl von detektierbaren Banden in der Zeitspanne zwischen 5 und 7 Minuten festgestellt werden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass bei 35°C verschiedene Zeiten unterschiedliche Fragmente favorisierten. Ferner waren längere Zeiten bei 43°C als bei 35°C effektiver in dem sie zu intensiveren Amplimeren führten.

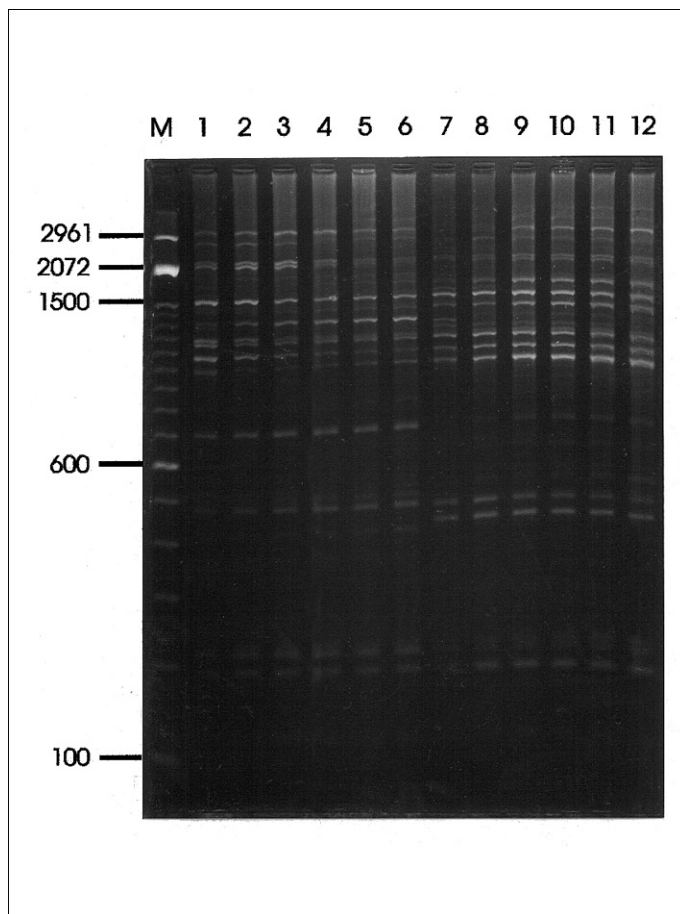


Abb. 9:

Die ersten 6 Reihen zeigen Muster die bei einer Anlagerungstemperatur von 35°C produziert wurden und die nächsten 6 bei einer Anlagerungstemperatur von 43°C. Es wurden immer Programme benutzt mit dem schnellsten Übergang zwischen Anlagerungs- und Extensionstemperatur. Die Reihen 1 und 7 zeigen Fragmente, die mit einer Anlagerungszeit von 1 Minute produziert wurden, die 2 und 8 mit 3 Minuten, die 3 und 9 mit 5 Minuten, die 4 und 10 mit 7 Minuten, 5 und 11 mit 9 Minuten, 6 und 12 mit 11 Minuten.

5.11 Rampe

Das nächste PCR Intervall wurde als das bedeutungsvollste für die Reproduzierbarkeit der RAPD Fragmente beschrieben (Sobral 1993). Spezieller, je länger die Überleitung von der Anlagerungs- zur Polymerisationstemperatur, desto stabiler die Fragmentmuster. Dieser Übergang wird auch als Rampe bezeichnet.

Wie die Abb.10 zeigt, wurde eine Serie von Experimenten durchgeführt, wobei 35 Zyklenprogramme benutzt wurden und die Dauer der Rampe von 0 bis 11 Minuten in 2 Minuten-Schritten verlängert wurde. Eine Dauer von 7 Minuten stellte sich als genügend heraus, da längere Rampen die Fragmentprofile nicht verbesserten. Im anschliessenden Test konnte beobachtet werden, dass eine Anlagerungstemperatur von 15°C mit dem schnellsten Übergang nur 2 bis 3 intensive Banden produzierte. Die entsprechenden Versuche bei 35°C und 43°C produzierten mehr Fragmente, jedoch ein insgesamt schwächeres Bild. Danach wurden 3 Parameter systematisch verändert: Mg^{+2} Konzentration, Zyklenanzahl und Dauer der Rampe. Die Produkte der Kombinationen von 2mM und 4mM MgCl, 35 und 50 Zyklen, schnellster Übergang und 7 Minuten Rampe werden im Photo aufgezeigt. Weitere Versuche wurden durchgeführt, bei denen unterschiedlich verlängerte Anlagerungszeiten (0, 180 und 300 Sek.) mit den entsprechenden Rampen benutzt wurden, ohne dass ein besonderer Effekt nachgewiesen werden konnte.

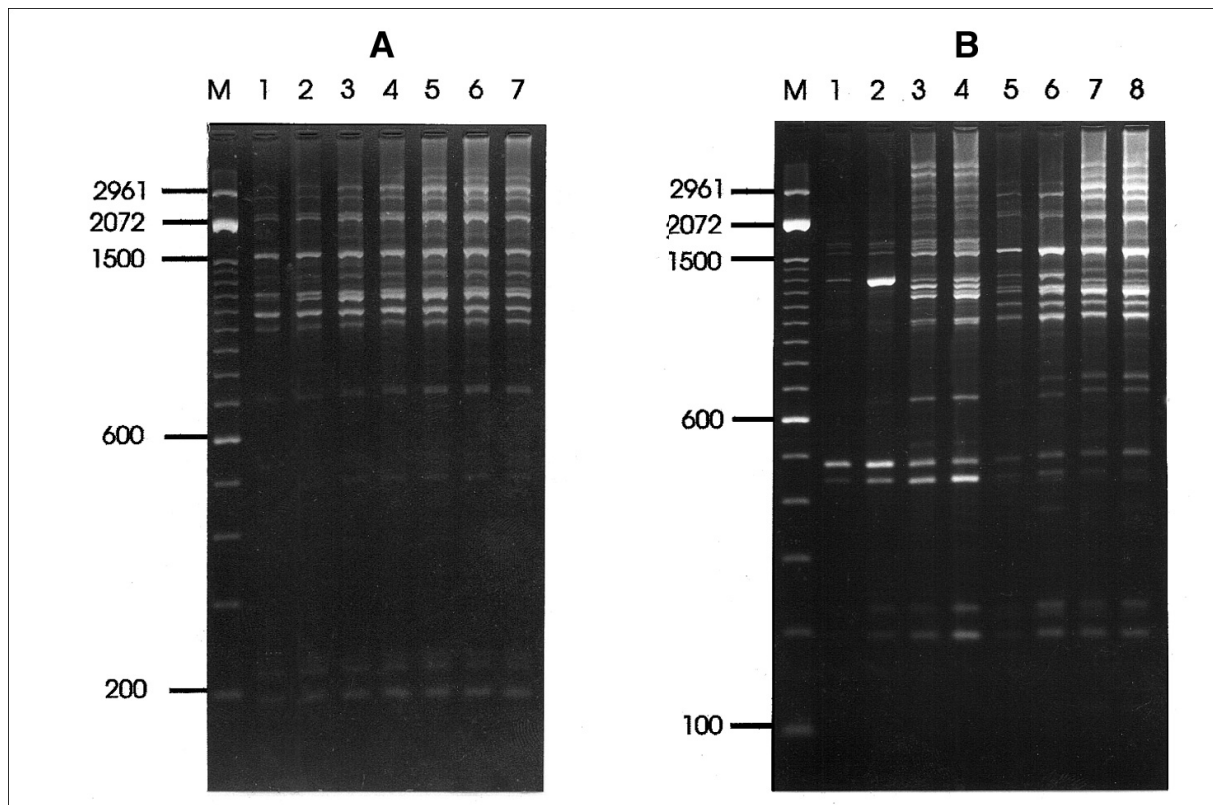


Abb. 10:

Photo A zeigt die Variation der Rampendauer. Die Reihen 1–7 entsprechen 0, 1, 3, 5, 7, 9 und 11 Minuten Rampen. Eine Rampenzeit von 7 Minuten war ausreichend.

Photo B demonstriert die Kombination von 3 Variablen: Anzahl der Zyklen, Mg^{2+} Konzentration und Rampe. In den ersten 4 Reihen werden die Produkte gezeigt die bei 2 mM und 4 mM Mg^{+2} produziert wurden. Die Reihen 1, 2, 5, und 6 zeigen Muster mit Rampe, während 3, 4, 7 und 8 Muster ohne Rampe. Die Zyklenanzahl bei 1, 3, 5 und 7 war 35, während sie bei 2, 4, 6 und 8, 50 Zyklen betrug.

5.12 Extensionszeiten

Das erste Experiment bestand in der Variierung der Extensionstemperaturen. Die Temperaturen wurden in 2°C Schritten von 66°C bis 80°C mit den entsprechenden Rampen überprüft, ohne dass grosse Unterschiede zwischen den Mustern sichtbar wurden. Weiter wurden Versuche bei einer Polymerisationstemperatur von 72°C mit Programmen durchgeführt, die entsprechende Rampen (11 sec/°C) und steigende Polymerisationszeiten, nämlich 0 – 5 Minuten, beinhalteten. Diese Serie wurde zusätzlich erweitert, in dem nicht nur Experimente mit einer Denaturierungstemperatur von 35°C, sondern auch mit 43°C durchgeführt wurden. Interessanterweise wurden zwischen den Mustern, die mit und ohne Polymerisationszeiten produziert worden sind, keine Unterschiede beobachtet. Eine Extensionszeit über 4 Minuten führte zur Vermehrung des Schmiere und zur Intensitätsabnahme der Banden.

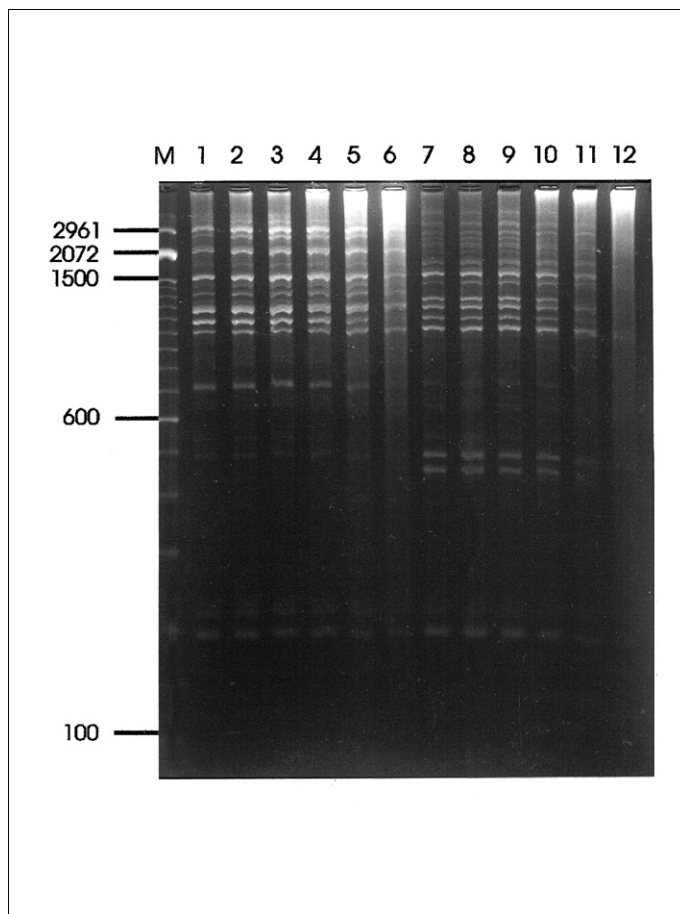


Abb. 11: Photo A zeigt die Variation der Extensionszeit. Die Muster der Reihen 1–6 wurden bei 35°C produziert, während die der Reihen 7–12 bei 43°C. Die Reihen 1–6 und 7–12 entsprechen 0, 1, 2, 3, 4, und 5 Minuten Extensionszeit. Interessanterweise vermehrte sich der Schmier je länger die Extensionszeit wurde. Die Produktmenge der Reihen 5, 6, 11 und 12 nahm auch zu.

5.13 Programmveränderungen

Während der Optimierung des thermischen Profils wurde versucht, manche Verbesserungen, die häufig in der klassischen PCR angewendet werden, auf die RAPD zu übertragen. Als erstes wurde die Denaturierungstemperatur nach den ersten 10 Zyklen von 94°C auf 88°C reduziert, mit dem Ziel die Produktion der niedermolekularen Fragmente zu fördern (Yap and McGee 1991).

Der "Plateau"-Effekt (Sardelli 1993) spielt eine Rolle in den letzten Zyklen der PCR und bestimmt somit die Produktmenge. Eine Möglichkeit dieses Phänomen zu überwinden, ist die

Extensionszeit in den letzten Zyklen, wenn die Produktkonzentration die Enzymkonzentration überschreitet, zu verlängern. Deshalb wurden die Tests mit Polymerisationszeiten durchgeführt, die sich durch Addition von 10 Sekunden bei jedem zweiten Zyklus für die letzten 20 Zyklen zusammensetzten.

Der "Plateau"-Effekt kann auch durch die Abnahme der Denaturierungsleistungsfähigkeit verursacht werden und deshalb wurde bei Versuchen die Denaturierungstemperatur auf 96°C erhöht.

Um die Auflösung der RAPD Marker zu verbessern, wurden weitere PCR Versuche mit einer zweiten anschliessenden PCR durchgeführt, die unter stringenden Bedingungen ablaufen würde. Nach 50 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 35°C wurden 2 µl vom primären PCR Produkt zu 48 µl PCR Volumen mit 1,5 U Enzym addiert und bei einer Anlagerungstemperatur von 43°C für 20 Zyklen inkubiert.

5.14 Enzyme

Im folgenden wurden 37 unterschiedliche DNA Polymerasen (siehe Metaterialien und Methoden) von 16 Anbietern getestet. DNA Polymerasen, die vom *Thermus thermophilus* herkommen, produzierten ähnliche aber nicht identische Bandenmuster, wogegen die Polymerasen aus *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus litoralis* sehr wenige Fragmente amplifizierten. Alle Enzyme ergaben reproduzierbare Ergebnisse.

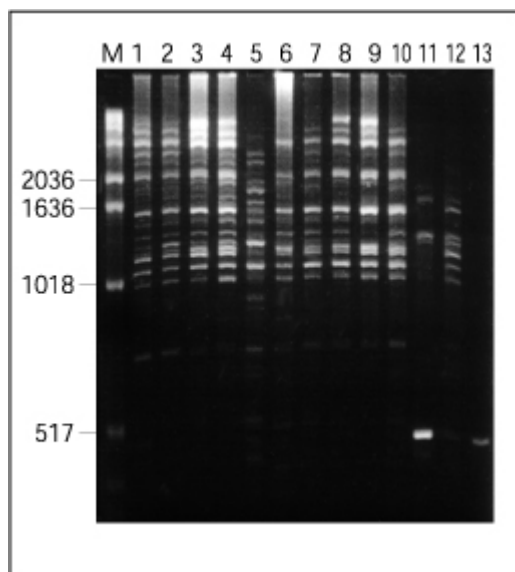


Abb. 12, Bild 1:

Enzyme: Amplifikationen in folgende Reihenfolge mit 2,5U Enzym: Invitaaq, Invitaaq mit Trehalose (finale Konzentration von 10%), Combipol, Combipol mit Trehalose (finale Konzentration von 10%), Appligene Oncor, Super Taq Plus, Takara Taq, Takara Ex Taq, Takara LA Taq, Qiagen Taq, Qiagen Taq mit Q-Lösung ohne Mg^{+2} , Qiagen Taq mit der Q-Lösung und Mg^{+2} , Gibco Taq mit Betaine (finale Konzentration von 3M).

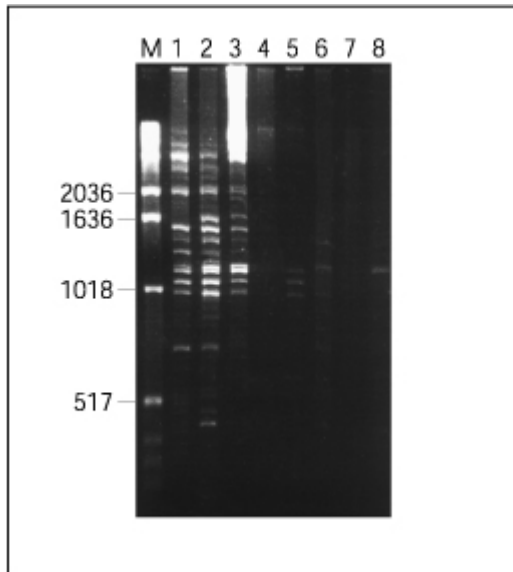
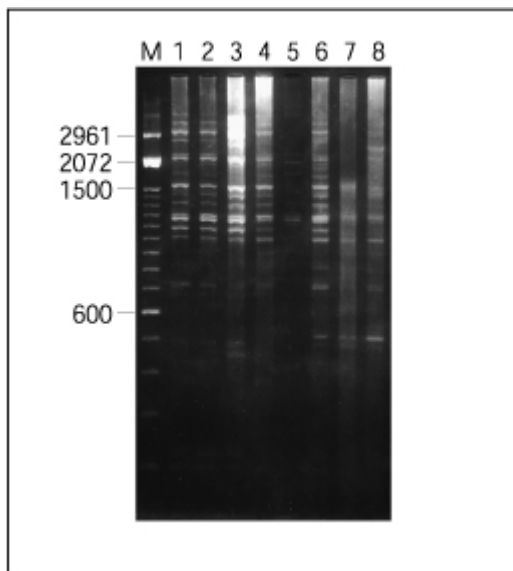


Abb. 12, Bild 2:

Amplifikationen in folgende Reihenfolge mit 2,5U Enzym: Goldstar, Dap, Pwo, Vent, Vent mit DMSO(finale Konzentration von 5%), Vent exo-, Deep Vent, Deep Vent exo-.

Bild 3: Amplifikationen in folgende Reihenfolge mit 2,5U: Gibco Taq, Stratagene Taq, Stratagene Taq Plus, Stratagene Taq mit Extender, Stratagene Pfu, USB Taq, USB Tth und USB Hot Tub.



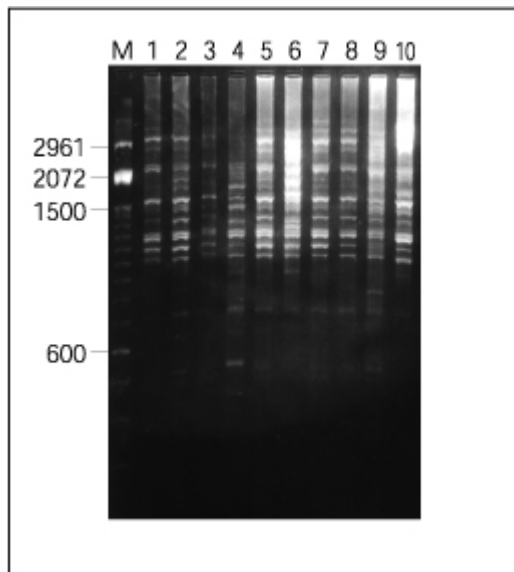


Abb. 12, Bild 4:

Amplifikationen in folgende Reihenfolge mit 2,5U Enzym: Gibco Taq, Promega Taq, Perkin Elmer Amplitaq, Stoffel Fragment, MBI Fermentas Taq, MBI Frementas Tth, Pharmacia Taq, Boehringer Mannheim Taq, Boehringer Mannheim Tth und Boehringer Mannheim Expand High Fidelity.

Von der grossen Anzahl der *Thermus aquaticus* (Taq) DNA Polymerasen zeigten 4 fast identische Bandenmuster: diejenigen von Life Technologies/Gibco, Stratagene, Pharmacia und Boehringer Mannheim. Folgende Enzyme bevorzugten die Produktion von grossen Fragmenten, manchmal auf Kosten der niedermolekularen: Combipol von Invitex, Takara LA Taq und in kleinerem Masse Takara Ex Taq, Stratagene Taq Plus mit dazu addierten Extender, Expand high fidelity von Boehringer Mannheim und Dap von Eurogentec. Das Hot Tub von USB/Amersham war dabei nicht so erfolgreich.

Es ist beschrieben worden, dass die Amplifizierung mit dem Stoffel Fragment die Produktion der kleinen Banden fördert (Sobral 1993). In einer Serie von Experimenten konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Zusätzlich wurde aber registriert, dass die Banden mit einem molekularen Gewicht von 2 kb und grösser an Intensität abnahmen. Weitere Versuche mit längeren Rampen (bis zu 32 sec/°C) führten zu keiner wesentlichen Verbesserung des Bandenmusters. Eine zusätzliche Verlängerung der Extensionszeit auf 5 Minuten hatte ebenfalls keinen Beitrag in dieser Richtung leisten können. Eine Denaturierungstemperatur von 98 °C führte zur Amplifizierung von nur 2 niedermolekularen Banden. Unterschiedliche

MgCl₂ Konzentrationen führten auch zu Musterveränderungen; z.B. wurden bei 2 mM MgCl₂ niedermolekulare Banden bevorzugt produziert, die bei 4 mM nicht sichtbar waren. Hohe Konzentrationen wie 8 und 10 mM MgCl₂ haben sich nicht als vorteilhaft herausgestellt – ganz im Gegenteil – es kam zur Verkleinerung des Spektrums der produzierten Banden.

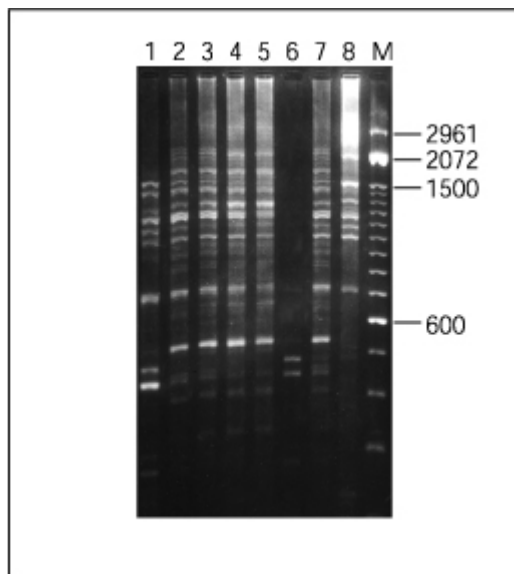


Abb. 13:

Amplifikation mit dem Stoffel Fragment: (1) 2,5U bei 2mM Mg^{+2} und 11Sek./°C (2) 2,5U bei 4mM Mg^{+2} und 11Sek./°C, (3) bis (5): 2,5U bei 4mM Mg^{+2} und entsprechenden Rampen von 16 Sek./°C, 24 Sek./°C, 32 Sek./°C, (6) wie (1) aber mit Denaturierung bei 98°C, (7) wie (1) aber mit eine Extensionszeit von 5 Min., (8) 2,5U Gibco Taq bei 4mM Mg^{+2} und eine Rampe von 11 Sek./°C..

Als nächster Schritt wurde das Stoffel Fragment kombiniert eingesetzt. Zunächst mit der Taq DNA Polymerase von Gibco/Life Technologies, danach mit Goldstar Polymerase von Eurogentec und zuletzt mit der Pfu DNA Polymerase von Stratagene.

Da die Gibco Polymerase ein Optimum bei 50 mM KCl hat, während das des Stoffel Fragments bei 10 mM liegt, wurde eine finale KCl Konzentration von 30 mM KCl gewählt. Kombinationen mit Enzymkonzentrationen von 1 U, 1,25 U und 2 U bei 4 mM $MgCl_2$ haben ähnliche Muster produziert wie bei alleiniger Anwendung der GIBCO Polymerase. Es folgten Kombinationen der Goldstar Polymerase mit dem Stoffel Fragment mit Konzentrationen von 20 mM $(NH_4)_2 SO_4$ und 10 mM KCl d.h. den entsprechenden Optima für diese Enzyme, die zur Intensitätszunahme von mehreren niedermolekularen Banden ca 400 – 500 bp führten, ohne dass die Produktion der grossen beeinträchtigt worden ist. Die Kombination des Stoffel Fragments mit der Pfu DNA Polymerase von Stratagene, die auch ein KCl Optimum von 10 mM hat, führte zur Produktion von nur 2 niedermolekularen Banden ca 200 – 300 bp. Bei der Anwendung der Klentaq von Mobitec (Handelsname Mobi-Tab K) wurde festgestellt, dass

das produzierte Muster Unterschiede zu dem von der Deltapol (Klentaq der Firma Invitex) aufwies. Das Muster der Deltapol war durch eine Betonung der Banden unter 1 kb charakterisiert, während das der Mobi-Taq K einer Taq DNA Polymerase ähnelte (z.B. Gibco oder Invitex).

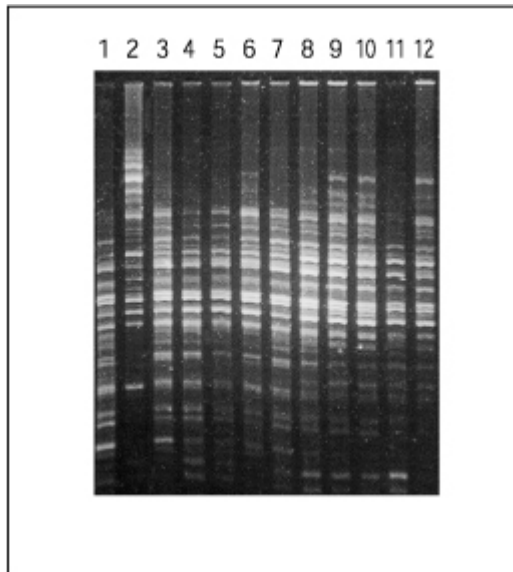


Abb. 14:

Von (1) bis (12): Amplifikation mit (1) 12,5 U Klentaq bei 8mM Mg^{+2} , (2) 2,5 U Invitaq bei 4mM Mg^{+2} , (3),(4),(5),(6) Klentaq und Invitaq mit entsprechenden Einheitenanalogien 10:1, 5:1, 2,5:1, 2,5:1 und jeweils 10U, 10U, 10U und 6,25U Klentaq bei 8mM Mg^{+2} , (7),(8),(9),(10),(11),(12) Klentaq und Combipol mit entsprechenden Einheitenanalogien 20:1, 5:1, 2,5:1, 2,5:1, 2,5:1, 2,5:1 und jeweils 10U, 10U, 10U, 8U, 8U und 6,25U Klentaq bei 8mM Mg^{+2} . In der (11) wurde zusätzlich Trehalose (finale Konzentration 10%) benutzt.

Als nächster Schritt wurden Kombinationen von Deltapol, Invitaq und Combipol (Invitek) getestet. Die Enzyme konnten gemeinsam im Optiperm Puffer (10x Puffer, 500 mM K OH, PH 9,2 bei 25 °C und 0,5 % Tween 20) amplifiziert werden. Die $MgCl_2$ Konzentration war für diese Kombinationsexperimente einheitlich 8 mM. Bei der Kombination Klentaq und Invitaq wurden die Relationen 10:1, 5:1 und 2,5:1 Units untersucht, mit dem Einsatz von 10 U und bei 2,5:1 zusätzlichen 6,25 U Klentaq pro 50 μ l PCR Volumen. Bei der Kombination Deltapol und Combipol wurden die Relationen 20:1, 5:1 mit jeweils 10 U Klentaq pro 50 μ l getestet, während bei der 2,5:1 Analogie 10 U, 8 U und 6,25 U Klentaq eingesetzt worden sind. Zusätzlich wurde die Auswirkung von Trehalose auf das Muster bei 8 U Klentaq untersucht. Als letzter Versuch wurde eine Analogie 1:1 Units mit 8 Units Klentaq untersucht. Von den aufgeführten Kombinationen hat die 2,5:1 Klentaq: Combipol mit 8 U Klentaq die besten Ergebnisse erzielt. Das Bandenspektrum war das breiteste in dem mehrere Fragmente unter

1 kb dazu gewonnen wurden, ohne grosse Einbussen bei den Banden um 3 kb zu verzeichnen. Beobachtet wurde zusätzlich eine Intensitätszunahme bei den Banden zwischen 1 und 2 kb. Die Ergebnisse glichen sich, ob nun der Dilutionspuffer von Invitex (beinhaltet zu 50 % Glycerol) für das Mischen der Enzyme benutzt wurde oder nicht.

Mit der Vent DNA Polymerase wurde eine Serie von Experimenten durchgeführt, in der steigende Enzymkonzentrationen angewandt wurden. Obwohl die Ausbeute insgesamt niedrig war, zeigten die 0,5 U die besten Resultate: 8 Banden anstatt einer bei der Reaktion mit 2,5 U. Eine parallele Serie mit 5% DMSO Konzentration in Anlehnung an das für Vent DNA optimierte Protokoll (Cease, Potcova et al. 1994) endete ohne signifikante Verbesserung des Fragmentmusters.

Um das RAPD Protokoll für die Pfu DNA Polymerase zu optimieren, wurden die Anweisungen des Anbieters verfolgt und kleine Anpassungen vorgenommen. Um die Produktion von Amplimeren zu fördern, wurde die Anlagerungstemperatur um 5°C und 10°C erniedrigt, ohne dass ein Vorteil erzielt wurde.

Die Effizienz der Amplifikation wird häufig durch Additiva beeinflusst, wie DMSO und Glycerol. Glycerol (finale Konzentration 2,5% und 5%) und die gemeinsame Benutzung von DMSO (finale Konzentration 5% Glycerol und 10% DMSO) verhinderte die Bandenproduktion. DMSO als alleiniger Zusatz (finale Konzentration 10%) liess das Muster ebenfalls unverändert. Abschliessend ist noch zu erwähnen, dass eine Magnesium-Konzentration von 2 mM für die Produktion von einigen zusätzlichen Banden verantwortlich war.

Die Firma Qiagen bietet zusammen mit der Taq DNA Polymerase auch eine Q-Solution an. Es wurden Versuche mit dieser Lösung abwechselnd mit und ohne $MgCl_2$ Benutzung durchgeführt. Die Anwendung der Q-Solution ohne $MgCl_2$ führte zu einer Reduktion des Musters auf zwei bis drei Banden und die Produktion einer prominenten Bande ca 400 bp. Das mit der Q-Lösung und $MgCl_2$ produzierte Muster konnte die Qualität desjenigen ohne Q-Solution nicht erreichen. Weitere Tests der Q-Solution in Verbindung mit anderen Enzymen wurden auch durchgeführt. Das Stoffel Fragment zusammen mit der Q-Lösung ergab keine Banden, während mit $MgCl_2$ eine Bande produziert wurde.

5.15 PCR Maschinen

Es wurden die DNA-Mobilitätsmuster unterschiedlicher PCR Maschinen von 6 Anbietern untersucht: Perkin Elmer (9600, 2400, 2700), Landgraf (Varius V), Biometra (Trio-

Thermoblock), MJR (100 PTC, 150 PTC), Pharmacia (ATAQ Controller) und Appligene (Crocodile). Das erste PCR-Protokoll enthielt den schnellst möglichen Übergang von der Anlagerungstemperatur der Primer zur Polymerisationstemperatur während im zweiten eine Rampe benutzt wurde. Die Thermocycler haben unter Anwendung des ersten Protokolls Fragmentmuster generiert die sich in der Anzahl und Intensität der Amplimere unterschieden. Es wurde festgestellt, dass unter diesen Bedingungen die kürzeren Banden bevorzugt wurden, während die Produktion der längeren abnahm. Das zweite Protokoll, in dem eine Rampe von 11sec/°C benutzt wurde, mit Ausnahme des Appligene Crocodile Gerätes das eine geringste Anstiegsrate von 9sec/°C bietet, produzierte homogene Bandenmuster. Allerdings absolut identisch waren nur die von der Maschine Perkin Elmer, Landgraf und MJR. Spektakulär war der Einfluss der Rampe auf das Muster der Appligene Maschine. Es ist noch zu erwähnen, dass die Maschine der Firma Biometra auch mit Rampe keine absolut reproduzierbaren Ergebnisse produzierte. Für jedes PCR Gerät wurden die ReaktionsHütchen benutzt die der Anbieter/Hersteller vorschreibt. Zusätzlich wurden im Perkin Elmer Thermocycler 0,5ml Eppendorf Hütchen benutzt, in denen die 50µl Reaktionsvolumen mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet wurden. In diesem Fall wurde auf die Deckelheizung verzichtet, die bei Benutzung der 0,2ml PE Hütchen angewandt wurden. Das Muster das bei Nichtanwendung der Rampe mit den PE Hütchen produziert wurde, wies grosse Unterschiede zu dem entsprechenden mit Eppendorf Hütchen genierten Muster auf. Die Eppendorf Hütchen haben die Produktion der hochmolekularen Banden erleichtert und auch noch eines niedermolekularen Fragments. Bei Anwendung der Rampe gab es zwischen den Amplimeren nur einen Unterschied: Die PE Hütchen haben ein ca 1,2 Kb Fragment zusätzlich produziert. Es ist noch zu erwähnen, dass die unterschiedlichen Typen des selben Herstellers immer gleiche Resultate produzierten.

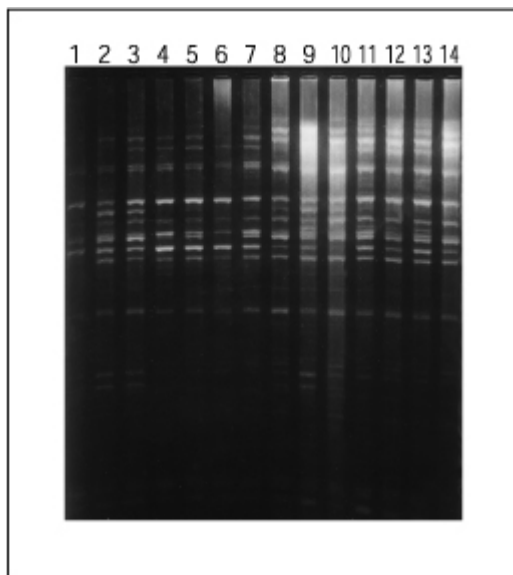


Abb. 15:

Die RAPD Profile der ersten 6 Reihen wurden ohne Rampe, während die folgenden 6 Reihen mit Rampe produziert wurden. Die Muster 1 und 8 wurden mit der Appligene, die 2 und 9 mit der Pharmacia, die 3 und 10 mit der Biometra, die 4 und 11 mit der MJR, die 5 und 12 mit der Landgraf und die 6,7,13 und 17 mit der Perkin Elmer PCR-Maschine produziert. Die 6 und 13 wurden mit den 200 µl Perkin Elmer Hütchen produziert, während die 7 und 14 mit den 500 µl Eppendorf Hütchen.

5.16 Visualisierungsmöglichkeiten der DNA

Wie schon erwähnt war das Ziel der Optimierung die Visualisierung von Banden mit einer Länge kleiner als 1 Kb. Um dieses Ziel zu erreichen wurden 2-Chloroacetaldehyd (CAA) benutzt, das wie publiziert (Premaratne, Helms et al. 1993) nach Reaktion mit der doppelsträngigen DNA die Ethidiumbromidfluoreszenz verstärken soll. CAA ist eine mutagene Chemikalie die mit Adenin, Cytosin und Guanin reagiert. Die mit steigenden CAA Konzentrationen versetzten PCR Produkte zeigten nach Visualisierung auf einen UV-Transilluminator keine sichtbaren Unterschiede zur negativen Kontrolle, diejenige ohne CAA Behandlung.

5.17 Dynamin

Die Amplifikation der DNA Paare, d.h. der DNA aus Mammatumorzellen und aus gesunden Zellen (Leukozyten), von sechs Patientinnen mit dem Primerpaar STARK und TELO3 hat bei allen sechs Fällen zu identischen Ergebnissen geführt. Wie man von der Abbildung 16 entnehmen kann, wurden drei Unterschiede festgestellt: Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 500, 700 und 1000bp. Bei allen drei Banden wurde der Versuch gemacht sie weiter zu charakterisieren mittels Klonierung und Sequenzierung. Da es bei den Banden um eine Komigration von DNA Fragmenten handelt (Comes et al. 1997), wurden hier mehrere Fragmente analysiert. Die Sequenzen wurden mit dem BLAST Programm auf Homologien zu bekannten Sequenzen untersucht. Bei einer ca. 700bp lange Sequenz bestand erhebliche Homologie zur Homo sapiens Dynamin I Sequenz. Der Vergleich zwischen der Sequenz eines Fragments und der Teilsequenz des Klons hRPK.401_G_18, der sich auf dem Chromosom 9 lokalisieren lässt, ergab auf DNA Ebene eine Homologie von ca. 83%. Das Fragment beinhaltet eine kodierende Sequenz die sich von Base Nr. 424 bis zum Ende erstreckt, auf DNA Ebene eine Homologie von 92% zur Dynamin I aufweist und die, wenn sie in eine Aminosäuresequenz übersetzt wird, eine Homologie von 88% zum entsprechenden Dynamin Segment erreicht.

Vergleich der Fragmentsequenz mit genomischer DNA

```

Fragm: 1   tgctgggtgggtggcacgtacctatagtcctagctactcgacaggctgacattggaggatca 60
          ||||| ||||| || ||||| ||||| || ||||| ||||| ||| |
Clone: 1   ggttgggtggtagcacgtgcctgtagtcctagctactggagaggctgacattggaagataa 60

Fragm: 61   ctttgagcccaagaagttgaggctacagtgagtggatctcgcccactgtcctccagcc 120
          ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Clone: 61   ctttgagcccaggaggttgaggctacagtgagtggtaatctc-cccactgtactccagcc 119

Fragm: 121  tagcgacagagcatgatcctatctcca--aaaaacatttttaagaa--actgagtagacc 176
          | | | |||| | || ||||| || | | | | | |||||
Clone: 120  tggtgaaagagcgagaccctatctccaggaagaagaaaaaaaaaacaactgagtagaca 179

Fragm: 177  ggtgtcctgggtggcatgataggctcctgggtcccctcccagatgtgtgaccttggacaggt 236
          | | | ||||| ||||| ||||| ||||| || | | ||||| ||| |
Clone: 180  agagtctctgggtggcatgataggctcctaagtcccctcccggttctgtgaccttggtcagat 239

Fragm: 237  gacttttcctttggacctcagtgaccctatctgagtgagaaaagggtgggtggggaggcag 296
          ||||| ||||| ||||| || ||||| ||||| || | |||||
Clone: 240  gacttttcctgtggacctcagtgtcctcatctgagtgagaaaagcgcggtggggagggtga 299

Fragm: 297  atctttgagtctaagcgggtgtagaagccgcgtctgaaaagccatactcagggctccaagt 356
          |||| | |||| | || |||| | ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Clone: 300  atcttccagtctacgcagtgtaggagccgcgtctgaaaagcca----ca----- 359

Fragm: 357  ccagcacacagtcccagcagggcccggcagga-ggccagggcagcaaaggcatcaggtcc 415
          |||| | ||||| ||||| || ||||| || ||||| || |||||
Clone: 345  ccagctcacagtcccagcagggcccgggtggggcgccagggcggcacaggcatcaggtcc 419

Fragm: 416  caacctccttcctcttttgcccgtctcAGACCAAGGAGTTCATCTTCTCGGAGCTGCTG 475
          | | ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Clone: 405  ccacctccttcctcttttgccactcgcAGACCAAGGAGTTCATCTTCTCGGAGCTGCTG 479

Fragm: 476  TCCAACCTGTACTCACGTGGGGACCAGAAAACGCTGATGGAAGAGTCGGCAGAGCAGGCA 535
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Clone: 465  GCCAACCTGTACTCGTGTGGGGACCAGAACACGCTGATGGAGGAGTCGGCGGAGCAGGCA 539

```

```

Fragm: 536 CAGTGGCGCGACGAGATGCTGCGCATGTACCACGTGCTGAAGGAGGCACTCGGCATCATC 595
          ||| |||||
Clone: 525 CAGCGGCGCGACGAGATGCTGCGCATGTACCACGCACTGAAGGAGGCGCTCAGCATCATC 599

Fragm: 596 GGCGACATCAACACGACCACC 616
          |||||
Clone: 585 GGCGACATCAACACGACCACC 605

```

Vergleich der kodierenden Sequenz des 700 bp Fragmentes mit der entsprechenden
Dynamamin-Segment auf Aminosäureebene

```

Dynamamin  TKEFIFSELLANLYSCGDQNTLMEEAEQAQRRDEMLRMYHALKEALSIIGNINTTT
Fragment  -----S----R---K-----W-----V----G---D-----

```

Da, wie man von der Abbildung 16 entnehmen kann, die Banden sehr nah beieinander im Agarosegel laufen, wurde, um eine Bestätigung zu erhalten, dass auch tatsächlich diese dynaminbeinhaltende Sequenz im Tumorgewebe amplifiziert ist, eine Hybridisierung des klonierten Fragments gegen die auf eine Membran geblottete RAPD PCR vorgenommen. Auf der Abbildung 17, wo das Hybridisierungsergebnis dargestellt wird, sind zwei Banden zu sehen, deren Intensität bei allen sechs Patientinnen im entsprechenden Tumormaterial stärker war. Die obere Bande entspricht dem 700bp und die untere Bande dem 500bp langen Fragment. Die Gleichmässigkeit der Ergebnisse führt zur Annahme, dass die kleinere Bande eine Teilsequenz der grösseren ist und dass der Primer bei der Synthese sich früher vom Template abgekoppelt hat.

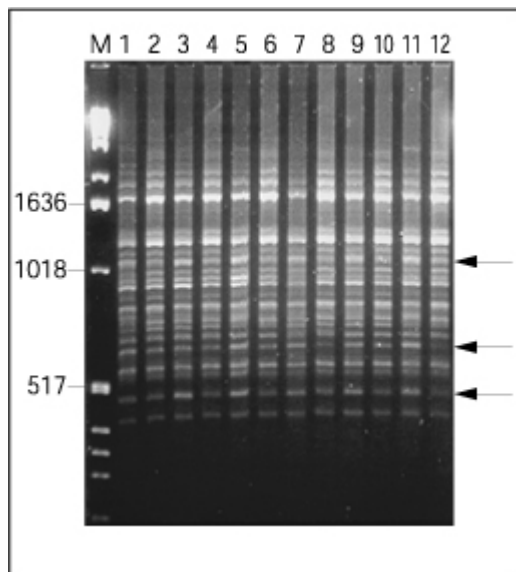


Abb. 16:

Amplifikation von sechs Tumorgewebe- und Leukozyten-DNA-Paaren mit den STARK und TELO3 Primer. Sichtbar sind drei Unterschiede mit einem Molekulargewicht von 500, 700 und 1000bp.

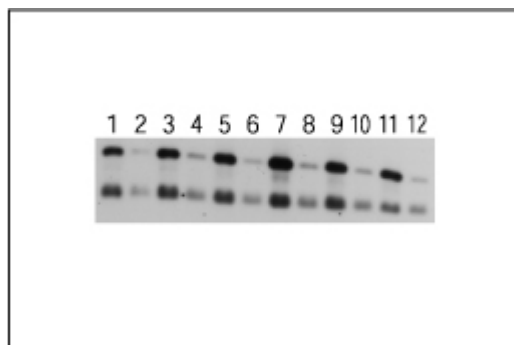


Abb. 17:

Die Hybridisierung ergab zwei Banden für jede Probe. Die Banden aus dem Tumorgewebe zeichnen sich durch eine höhere Intensität aus, was für eine Amplifikation der entsprechenden Sequenzen spricht. Die obere Bande entspricht dem 700bp langem Fragment, die untere dem 500bp langem Fragment.

6 DISKUSSION

6.1 Zyklen

Die ersten Amplifikationen wurden mit 50 Zyklen unternommen. Die Serie von Versuchen wurde durchgeführt um die kleinste Anzahl von Zyklen zu bestimmen, bei der das Fragmentmuster stabil bleibt. Mit 35 Zyklen ist dieses Ziel erreicht, was die Dauer der PCR erheblich reduziert. Experimente mit immer grösserer Anzahl von Zyklen haben gezeigt, dass wie auch bei der Standard-PCR (Bell and DeMarini 1991) der Schmier, also unspezifische hochmolekulare Banden die aus der Verlängerung der schon vorhandenen Produkten stammen, zunahm. Im Gegensatz dazu wird in der Standard-PCR eine Verringerung der Menge des Produkts oder sogar völlige Abwesenheit registriert.

6.2 DNA Konzentration

Die DNA Konzentration Variierungsversuche haben gezeigt, dass sehr niedrige oder sehr hohe DNA Konzentrationen zu grossen Problemen in Bezug auf die Reproduzierbarkeit führen können, was ein Hinweis darauf ist, dass die DNA/Primer Ratio eine wichtige Rolle im "Random Priming" spielt. Die Tatsache, dass 0,1 ng und 1 ng humaner DNA den DNA Gehalt von 15 und 150 Zellen entsprechend representieren (eine menschliche Zelle beinhaltet 6 pg DNA), weist darauf hin dass man RAPD mit sehr geringen Mengen durchführen kann. Es konnte festgestellt werden, dass für eine Konzentrationsspanne von 50 bis 550 ng konstante Resultate erzielt werden. Die Empfehlung ist in diesem Konzentrationsspektrum zu bleiben, wenn RAPD Experimente mit humaner DNA durchgeführt werden. Eine Alternative wäre am Anfang der Experimente eine kleine Verdünnungsreihe von 50 bis 500 ng oder mindestens zwei Konzentrationen in diesem Spektrum anzusetzen um diese Empfehlung zu bestätigen. Für diese anfänglichen Versuche sollte ein Primer oder ein Primerpaar benutzt werden, der kein sehr komplexes Fingerprintermuster produziert, so dass der Vergleich vereinfacht wird. Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen können auch auf Mängel der DNA Qualität zurückgehen. Als DNA Isolierungsmethode wurde hier die Phenol/Chloroform/Proteinase K Methode benutzt, die für eine sehr gute DNA-Qualität bekannt ist. Dieser Punkt wird später noch kommentiert. Die anfänglich zufällig gewählte Menge von 100 ng ist in diesem Spektrum und hat beständige Resultate erbracht.

Für die weiteren Experimente wurde diese Menge beibehalten und nicht erhöht um etwa in die Mitte des Spektrums zu gelangen um DNA zu sparen. Die Beobachtung, dass kleine DNA Konzentrationsunterschiede das Bandenmuster nicht verändern lässt die Benutzung

der zugeschnittenen DNA des Bakteriophagen für die Konzentrationsbestimmung der DNA-Proben zu, vor allem wenn ihre Menge sehr niedrig ist.

6.3 DNA Isolierungsmethoden

Alle DNA Isolierungsmethoden ausser der Chelex Methode haben reproduzierbare und identisch miteinander Resultate produziert. Es wurden Methoden benutzt die zu einer Gewinnung von hochmolekularer DNA führten, wie die PFGE und die Chloroform/Phenol/Proteinase K Methode, und auch Methoden die wegen der Scherkräfte niedermolekulare DNA produzierten z.B. die Kit Systeme. Die Uniformität der Ergebnisse beweist die Robustheit des random priming. Interessanterweise konnte mit dem Harz Chelex, das in der forensische Medizin angewandt wird keine Gleichmässigkeit der Muster erzielt werden, trotz des Versuches den Isolierungsprozess mit Proteinase K zu unterstützen, was dafür spricht dass spezifische Primer eine schlechte DNA Qualität tolerieren als random Primer. Auch die Amplifikation aus Vollblut war unbefriedigend da nur sehr kleine Banden produziert wurden. Im Gegensatz dazu sind schon Fragmente bis 900kb lang mittels spezifische Primer amplifiziert worden.

Die Mischung von humaner mit bakterieller DNA sowie die Mischung von DNA zweier Individuen hatte als Ziel eine Kontamination zu simulieren. Die Ergebnisse weisen daraufhin dass schon geringe Mengen fremder DNA das Muster verändern können. Bei beiden Experimenten genügten 5-10ng humaner oder entsprechender bakterieller DNA, was ein Beweis für die Anwendung der RAPD in der molekularen Onkologie spricht. Ein Gewebe das auch nur zu 5-10% von Tumor durchsetzt ist, kann im Vergleich zum gesundem Gewebe durch die Abwesenheit oder Anwesenheit von Fragmenten differenziert werden.

6.4 Mg⁺² -, Primer - und KCl Konzentrationen

Die optimale Mg⁺² Konzentration wurde durch folgende Kriterien festgelegt: a) Konsistente Reproduzierbarkeit von PCR-Produkten und b) maximale Anzahl von RAPD PCR Banden.

Die Tests mit unterschiedlicher Mg⁺² Konzentration haben gezeigt, dass Mg⁺² grossen Einfluss auf die PCR hat, dass 4mM der Umschlagpunkt ist und dass danach das Fragmentmuster sich kaum mehr verändert. Im Gegensatz dazu war das Muster bei niedrigen Konzentrationen auffälliger wie der Übergang von 1,5 zu 2 mM zeigte. Interessant ist auch, dass während der Standard PCR eine Mg⁺² Konzentration von 1-2 mM eher angebracht ist um keine unspezifischen Produkte zu generieren, in RAPD's die benötigte Mg⁺² Menge die doppelte ist. Es gibt Wissenschaftler (Park and Kohel 1994) die eine Mg⁺² Optimierung für jeden benutzten Primer oder Primer-Kombinationen empfehlen, wenn man

mit der RAPD polymorphe Marker generieren möchte. Wenn der Effekt des Mg^{+2} nicht verifiziert wurde, kann es durchaus sein, dass falsche DNA Polymorphismen auftauchen, die auch ein Problem für die Produzierbarkeit darstellen könnten.

Variationen der Konzentrationen von Primer, Desoxyribonukleotiden und KCl haben gezeigt, dass niedrige Änderungen das Fragmentmuster unbeeindruckt liessen. Man kann daraus schließen, dass die Fingerprints eigentlich sehr stabil sind und dass eventuelle Pipettierfehler keinen Einfluss haben.

Interessant war die bevorzugte Produktion einer Bande während der Primerkonzentrationsvariation. Die Produktion dieser 1,2 kb langen Bande, die nur detektierbar war, wenn die SPAP5 Konzentration höher als die von SP3 war, wird wahrscheinlich vom ersten Primer dirigiert.

6.5 Denaturierung

Die Denaturierung der DNA Stränge findet meistens bei einer Temperatur von 94°C statt. Sie stellt eine moderate Temperatur dar, bei der die DNA Schäden wie die Depurinierung und die Destabilisierung des Enzyms sich in Grenzen hält (Douglas and Atchison 1993; Gustafson, Alm et al. 1993). Die Lebenshalbwertszeit des Enzyms sinkt entsprechend von 130 zu 40 und zu 5 Minuten bei 92,5, 95 und 97,5°C.

Die Experimente haben gezeigt, dass Denaturierungstemperaturen von 96°C - 92°C ein identisches Muster produzierten und dass eine Zeit von 60 Sekunden ausreichte, um eventuell schwierigen Amplifikationen von einzelnen Banden zu unterstützen. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass 15 Sekunden nicht genügend waren für die Wärmeleitung vom Heizungsblock entlang der Wände der PCR-Hütchen und die Überführung des PCR-Volumens auf 94°C. Diese Zeit hängt sicherlich auch noch von der Thermocycler-Konstruktion und seiner thermischen Kontrolle ab und könnte deshalb zwischen Fabrikaten unterschiedlich sein.

Die Variierung des Überganges zwischen Denaturierungs- und Anlagerungstemperatur hat keine Unterschiede hervorgebracht, im Gegensatz zu anderen Berichten wie der von Schweder et. al. (Schweder, Shatters et al. 1995). In diesem Artikel wurde eine PCR-Maschine mit einem Hochdruckwasserzirkulator verbunden, so dass die Transitionsintervalle durch Veränderungen der Wassertemperatur und/oder des Wasserdrucks variiert werden konnten. Die Unterschiede, die auftauchten, Banden, die an Intensität zunahmten je länger die Transition war, wurden auf die stabilisierende Wirkung des verlängerten Überganges der Primer/Template Komplexe auf die Misspaarungen zurückgeführt. Der Unterschied zu den hier beschriebenen Experimenten besteht in der ausbleibenden Anwendung des langsamen Überganges zwischen 35°C und 72°C. Es sieht also so aus, dass mit der Benutzung der

Rampe von 35°C zu 72°C alle diese inkonstanten Duplexes stabilisiert werden, so dass der Einfluss von unterschiedlich langen Transitionen von 94°C zu 35°C wettgemacht wird. Über die Rolle dieser Rampe wird später noch länger eingegangen werden.

6.6 Anlagerungstemperatur/zeiten

Die Anlagerungstemperatur ist bei der mit spezifischen Primer durchgeführte PCR, einer der entscheidenden Parameter für den Erfolg der Reaktion. Im random priming sieht die Situation etwas anders aus. Bei den Experimenten mit Rampe konnten zwischen 15, 35 und 43 °C keine grossen Unterschiede festgestellt werden. Man konnte lediglich vereinzelt Banden beobachten, dessen Produktion bei unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen favorisiert wurden, offensichtlich aufgrund der unterschiedlichen Stringenz. Ohne Rampe wurden die Muster zwischen 35 und 43°C schon erheblich unterschiedlicher. Auch lange Anlagerungstemperaturen konnten keine absolut identische Muster produzieren. Längere Anlagerungszeiten führten interessanterweise bei 43°C zur Intensitätszunahme von Banden und zur Stabilisierung des Musters, während bei 35°C die Banden grösser als 1,5kb stabilisiert wurden. Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die Rampe eine Gleichmässigkeit verleiht, die auch eine verlängerte Anlagerungstemperatur nicht bieten kann. Wenn man die Muster bei 35 und 43°C mit den unterschiedlich langen Anlagerungszeiten und den mit Rampe vergleicht, stellt man fest, dass in den ersten alle Banden die auch in den anderen vorkommen vorhanden sind, aber mit unterschiedlicher Betonung und manche nur andeutungsweise. Die Tatsache kann auch eine Ursache für die nicht Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sein, die von anderen Wissenschaftler berichtet wird.

6.7 Rampe

Die Wirkung der Rampe ist sicherlich umstritten und die meisten PCR Anwender benutzen sie kaum, da sie auch die Dauer der Versuche verlängert. Von den hier beschriebenen Experimenten kann der Schluss gezogen werden, dass die Rampe der Faktor ist, der am meisten das Fragmentmuster beeinflusst, indem sie die Anzahl der Fragmente erhöht.

Eine erhöhte Mg^{+2} Konzentration hat den gleichen Effekt, aber die Auswirkung war grösser als die schnellstmögliche Transition zwischen Anlagerung und Extension angewandt wurde. Die Anzahl der Zyklen spielt eine untergeordnete Rolle da 50 Zyklen die Menge mancher oder aller schon vorhandener Banden erhöhte. Die Beobachtungen aus den Versuchen führen zur folgenden Feststellung:

- Die Reproduzierbarkeit ist auch ohne Rampe gegeben, wenn die Taq DNA Polymerase Konzentration mehr als 1 U pro 50 μ l PCR Reaktionsvolumen beträgt.
- Die Funktion des langsamen Überganges zwischen Anlagerungs- und Polymerisationstemperatur erhöht die Anzahl der produzierten Banden.

Das langsame Erhitzen von 35°C auf 72°C und die Tatsache, dass die Taq Polymerase schon bei niedrigen Temperaturen mit der Polymerisation anfängt, führt wahrscheinlich schon früh zur Stabilisierung des Primer/Template/Polymerase Komplexes und gibt der Polymerase genügend Zeit schon bei niedriger Temperatur eine Extension der Fragmente zu starten, die DNA später mit steigender Temperatur an Effektivität zunimmt. Wenn man die Produkte bei dem schnellsten Übergang mit den bei der Rampe vergleicht, kann man davon ausgehen, dass der langsame Temperaturanstieg von 35°C zu 72°C ein gewisses unspezifisches Andocken erlaubt. Für das Priming eines Primers sind die ersten 6 Basen an seinem 3'Ende wichtig. Es wurde auch beschrieben, dass für ein schwaches Priming schon eine 2 Basenpaarhomologie (Sommer and Tautz 1989) ausreicht. Viele PCR-Fragmente also, die mit Wirkung der Rampe produziert werden, sind wahrscheinlich unspezifische Amplimere, dessen Produktion aber erwünscht ist, da so eventuelle Polymorphismen zwischen Personen oder anderen Unterschiede zwischen Genome aufgedeckt werden können. Man sieht auch, dass manche PCR-Produkte hauptsächlich die grösseren erst an Intensität zunehmen, wenn die Rampe verlängert wird, was dafür spricht dass sie etwas unspezifischer sind als die anderen. Das Problem aber das entsteht ist, dass solche unspezifischen Produkte manchmal auch bei kurzen Übergängen produziert werden was dem Verlust der Produzierbarkeit zur Folge hat. Deshalb wurde am Anfang für die Experimente auch eine relativ lange Rampe gewählt (11°C/sec.), die jetzt bestätigt worden ist. Eine Rampe von 11°C/sec. ist also ausreichend um unter diesen Visualisierungskonditionen (Agarose Gel und Ethidiumbromidfärbung) ein stabiles Bild zu

geben. Ein längerer Übergang zwischen 35°C und 72°C hat keinen Einfluss mehr auf das Fragmentmuster.

6.8 Extensionszeiten

Die Beobachtung, dass die Variierung der Polymerisationstemperatur keine Unterschiede ergab, ist ein Hinweis dafür, dass die Extension schon bei niedrigen Temperaturen anfängt, obwohl die Taq Polymerase ihre volle Aktivität noch nicht entfalten kann. Wegen der langsamen Rampe ist die Polymerisation in dem Moment wo das PCR Reaktionsvolumen die 72 °C erreicht schon abgeschlossen. Deshalb ist eine Extensionstemperatur von z.B. 80°C nicht nötig, obwohl die maximale Aktivität des Enzyms bei 80 °C liegt. Beeindruckenderweise ist bei Benutzung einer Rampe die Extension fast überflüssig. Hier könnten evtl. 60 Sek. oder 120 Sek. Polymerisationszeit das Muster weiter stabilisieren. Die Ergebnisse bei den Anlagetemperaturen 35 °C und 43 °C waren vergleichbar. Interessanterweise führt eine Extensionszeit länger als 4 Minuten zu einer Vermehrung der hochmolekularen Banden die nicht aufgetrennt werden konnten und die dem sogenannten Schmier zugezählt werden. Diese Vermehrung ist auf Kosten der niedermolekularen Banden passiert, so dass die Intensität des ganzen Musters abnahm.

6.9 Enzyme

Aus den Versuchen konnte entnommen werden, dass die unterschiedlichen Polymerasen nicht absolut identische Muster produzieren, eine Tatsache die auch andere Wissenschaftler beobachtet haben (Schierwater and Ender 1993). Die Ursachen dafür sind die Unterschiede in der Definition der Einheiten die die Enzymaktivität beschreiben: Die Einheit der Pharmacia Taq DNA Polymerase wurde bei 70 °C, die der GIBCO bei 74 °C, die der Qiagen bei 72 °C, die von Stratagene bei 80 °C festgelegt. Darüberhinaus wurden die Enzyme von unterschiedlichen Stämmen einer Art isoliert, z.B. die Polymerase von MBI Fermentas aus *Thermus aquaticus* YT1, während die von Boehringer Mannheim aus *Thermus aquaticus* BM Stämmen. Schliesslich ist zu erwähnen, dass die Amplifikationen in Puffern stattfinden die auch unterschiedliche Konzentrationen aufweisen, weil offensichtlich die Optima der Enzyme variieren: z.B. das 10x Amplifizierungspuffer (AP) von Perkin Elmer (100mM Tris HCl, PH 8,3 bei 25 °C, 500 mM KCl), das 10 x AP von MBI Fermentas (100 mM Tris HCL, PH 8,8 bei 25 °C, 500 mM KCl, 0,8 % Nonidet P40), das 10 x AP von Takara Taq (100 mM, Tris HCl, PH 8,3, 500 mM KCl, 0,01 % (w/v) Gelatine), das 10 x AP von GIBCO (200mM Tris HCl, PH 8,4, 500 mM HCl, das 10 x AP von Goldstar/Eurogentec (750 mM Tris HCl, PH 9,0 bei 25 °C, 200

mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0,1 % (w/v) Tween 20) weisen sich nicht nur durch ihre unterschiedlichen PH und Salze aus, sondern auch durch die An- und Abwesenheit von Stabilisatoren.

Das Stoffel Fragment ist eine rekombinante DNA Polymerase die im Vergleich zur Taq DNA Polymerase um 289 Aminosäuren am N-Ende kleiner ist und nach Angaben des Anbieters durch ein breiteres Mg^{+2} Optimum (2,5-5 mM) eine erhöhte thermische Stabilität und eine zehnfach geringere Prozessivität charakterisiert wird. Die Versuche konnten zwar das Mg^{+2} Optimum bestätigen aber nicht die erhöhte thermische Stabilität, da Denaturierungstemperaturen von 98 °C zur Produktion von nur 2 Banden führten. Die geringe Prozessivität kann dafür verantwortlich gemacht werden, dass Banden über 2 kb ungenügend amplifiziert werden und dass lange Rampe eingesetzt werden müssen um ihre Produktion zu steigern.

Eine weitere Möglichkeit ist die Benutzung von Enzymkombinationen. Das Problem was sich ergibt, sind die unterschiedlichen Optima wie z.B. was die KCl Konzentration angeht. Die Gibco Taq hat wie auch die Amplitaq von Perkin Elmer ihr KCl Optimum bei 50 mM, während das des Stoffel Fragments bei 10 mM liegt. Deshalb konnten Kompromisse wie 30 mM KCl zu keinen befriedigendem Resultat führen.

Die Suche eines Enzyms oder eine Kombination von Enzymen die die Produktion der Fragmente unter 1 kb fördern, um ein möglichst st grosses Spektrum zu bekommen oder übersetzt einen grösseren Einblick in das Genom, konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Die 2,5 : 1 Kombination von Deltapol mit Combipol, die im Endeffekt eine Kombination von 3 Enzymen ist nämlich Taq DNA Polymerase, Klentaq und eines Enzyms mit proofreading Aktivität, z.B. Pfu oder Vent und 8 Units Klentaq zusammen mit 3 Units Combipol hat ein Muster produziert das für ein Screening der Genome verschiedener Individuen oder Arten auf Unterschiede benutzt werden kann. Danach, je nach dem molekularen Gewicht der Unterschiede, können in zweiter Linie Enzyme benutzt werden, die unterschiedliche Regionen betonen, z.B. Klentaq oder Stoffel Fragment für niedermolekulare Combipol und LA von Takara für die hochmolekulare Bereiche um die 3 kb und höher. Es ist selbstverständlich, dass Enzymkombinationen oder auch die aufeinanderfolgende Benutzung von mehreren Enzymen für das Screening der gleichen DNA sehr kostenaufwendig werden können, speziell wenn eine grosse Anzahl von Proben bearbeitet werden soll.

Interessanterweise wurden auch mit der DNA Polymerase des *Thermus thermophilus*(Tth) reproduzierbare Ergebnisse erzielt. Es ist bekannt, dass Fragmente die durch diese Polymerase synthetisiert werden eine erhöhte Mutationsfrequenz aufweisen wegen des Fehlens der proofreading. Exonukleaseaktivität am 3'Ende. Auf der anderen Seite, die Tatsache, dass mit der Pfu DNA Polymerase oder der Vent DNA Polymerase sehr wenige Fragmente generiert werden, kann mit der 12 mal erhöhten Fidelität der DNA Synthese

dieses Enzyms gegenüber der Taq DNA Polymerase erklärt werden, die wiederum auf der 3'→5'proofreading Exonukleaseaktivität basiert. Die Banden die keine hohe Homologie zum Ausgangsmaterial haben werden abgebaut. Das ist ein weiterer Hinweis, dass eine absolute Homologie nur für eine sehr kleine Anzahl von Banden zutrifft und wie das Muster zeigt, es sich um hochmolekulare Banden handelt.

Tests mit der Taq DNA Polymerase von Qiagen unter Anwendung der Q-Solution der gleichen Firma weisen darauf hin, dass diese Lösung Betaine beinhaltet. Das Muster mit der Q-Solution ohne die Benutzung von zusätzlichem MgCl₂ führte zu einem Muster das sehr ähnlich war mit demjenigen das mit Betaine (2,5M oder als finale Konzentration) produziert wurde. Die Firma Qiagen behauptet, dass die Anwendung der Q-Solution die zeitraubende PCR Optimierung ersetzen kann. Diese Behauptung kann aufrecht erhalten werden, nur wenn man von der Standard PCR spricht und nicht vom random priming.

6.10 PCR Maschine

Wie Penner et al. (Penner, Bush et al. 1993) zeigten, hängt die Anzahl der produzierten Fragmente vom Fabrikat des PCR-Gerätes und die DNA-Konzentration ab und steht nicht in Relation mit der Länge des benutzten Primer (Startmoleküle). Andere Wissenschaftler haben auch den PCR-Maschinentyp als Hauptsache der Bandenmustervariation vorgeschlagen, die auf Unterschiede im Temperaturprofil zurückzuführen sind (MacPherson, Eckstein et al. 1993; Meunier and Grimont 1993). Da die RAPD-Methode abhängig von der Anlagerungstemperatur der willkürlich ausgewählten Primer unter präzisen Konditionen ist, spielt das Temperaturprofil jedes Cyclers eine ausschlagende Rolle für die Reproduzierbarkeit und Intensität der Fragmente.

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass eine lange Rampe den möglichen technischen Unterschieden und eventuell Insuffizienzen (Unzulänglichkeiten) der PCR-Geräte entgegenwirkt und dass sie zur Uniformität der Amplifizierungskonditionen beiträgt, was das Temperaturprofil anbelangt.

Wenn man die Bandenmuster der Maschine der Firma Appligene beim Protokoll ohne Rampe beobachtet, könnte man vermuten, dass die reale Temperatur in den PCR Hütchen nie die nominelle (Solltemperatur) erreicht, da der Block des Gerätes schon wieder stark heizt bevor das Reaktionsvolumen die gewünschte Temperatur erreicht. Im Falle des Protokolls das die Rampe beinhaltet, ist der Temperaturanstieg so verlangsamt, dass die Ist-Temperatur in Hütchen die nominelle fast erreicht.

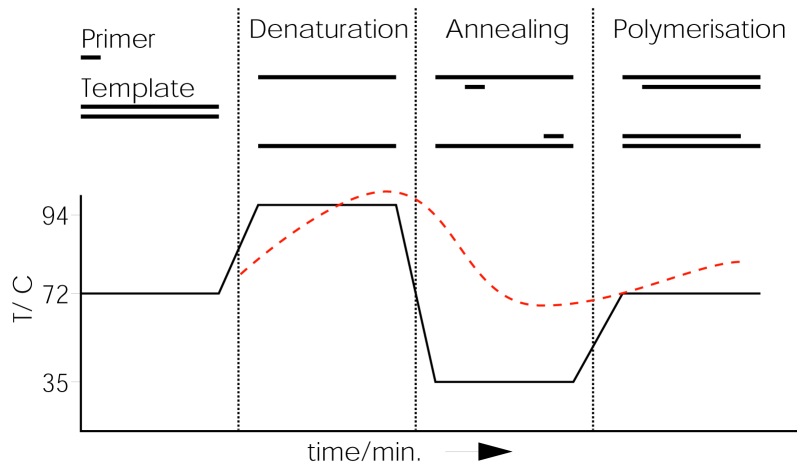


Abb. 18:

Die gestrichelte Linie repräsentiert die de facto Temperatur des PCR Reaktionsvolumens im Appligene Thermocycler während die durchgehende, die nominale. In diesem Diagramm wird eine PCR ohne Rampe analysiert.

Die Benutzung der Eppendorf-Hütchen in der PE-Maschine ohne Anwendung der Rampe führte zu grossen Unterschieden im Bandenmuster. Sie sind wahrscheinlich ein Hinweis für den sehr schnellen Temperaturübergang der zwischen den drei Stufen der PCR im PE-Gerät stattfindet.

Eine andere Ursache ist wahrscheinlich die erhöhte Wanddicke der Eppendorf-Hütchen im Vergleich zu den PE-Hütchen. Sie ist für die grössere Trägheit der Eppendorf-Hütchen im Bezug auf Temperaturveränderungen verantwortlich, so dass die gewünschten Temperaturen später eintreten und DNA für eine kürzere Dauer anhalten.

6.11 PAD, Heisser Start, PCR Additiva, Visualisierungsmöglichkeiten der DNA, PCR Programmveränderungen

Weitere Versuche die Reproduzierbarkeit zu sichern und die Breite des Musters zu vergrössern haben sich in mehreren Richtungen erstreckt. Durch die Addierung von Stoffen wie DMSO, Formamid, Glycerol, Trehalose, Betaine in unterschiedlichen Konzentrationen um Anlagerungsprobleme und Hindernisse die sich durch die sekundäre Struktur der DNA ergeben zu überwinden, durch die Änderung des PCR Programms im Sinne einer Betonung und Unterstützung von Teilen der Reaktion z.B. mittels Zeitverlängerung wie der Denaturierung (PAD) oder der Extension in den letzten Zyklen um limitierende Faktoren wie die kalte Oligonukleotidfusion oder das "Plateau" Phänomen entgegenzuwirken und auch

Versuche die Bandenanalyse zu verbessern mittels Substanzen wie CAA, haben sich nicht als hilfreich herausgestellt.

6.12 Primer

Aus den durchgeführten Experimenten lässt sich ableiten, dass der GC%(Guanosin, Cytosin) Gehalt der Primer keine Auswirkung auf die Reproduzierbarkeit der Muster hat, so dass ein Primer mit 40% GC Gehalt gleichwertig in diesem Punkt ist mit einem Primer der 70% oder 80% GC Gehalt aufweist. Bestätigt wurde allerdings, dass Primer mit hohem GC Gehalt eine grössere Anzahl von Amplimeren produzieren (Kubelik and Szabo 1995) In dieser Hinsicht wurden 2 Primer, nämlich ACR1(TTT TTT CAG G) und DCR1(ATA CTT ACC T) mit 40% GC Gehalt untersucht. Ob ein Primer aber trotzdem informativ ist, d.h. Unterschiede aufdecken kann, kann nur durch Experimente verifiziert werden.

Es muss hier sicherlich erwähnt werden, dass bei Primerkombinationen die Chance Unterschiede zu finden grösser ist, als bei einzelnen Primern; eine Beobachtung, die auch andere Arbeitsgruppen gemacht haben. Bei den Primer, die überhaupt keine Produkte generiert haben, muss davon ausgehen werden, dass die priming Orte (Anlagerungspositionen) weit auseinander liegen, d.h. dessen Abstand um die 5kb oder grösser ist.

Die Primer sollten, wenn möglich, die zwei Bedingungen von den Erstbeschreibern erfüllen, d.h. der GC Gehalt sollte 50-70% sein und die Sequenzen sollten keine Palindrome beinhalten. Manche konstruierte Primer konnten diese Voraussetzungen aufgrund der zugrundeliegenden Sequenzen, z.B. der TELO3, nicht erfüllen. Die Art auf der diese Sequenzen in den Mechanismen der Tumorgenese involviert sind, wird in den nächsten Paragraphen beschrieben. Die Tabelle 2 beinhaltet Primer und dessen Kombinationen die sich von tumorrelevanten Sequenzen ableiten lassen. Am Ende der Paragraphen wird auf die abgeleitete Primer hingewiesen.

Die Tumorgenese ist häufig mit DNA-Rekombinationen assoziiert, die in Deletionen von Tumorsuppressorgenen und veränderte Expression oder Amplifikation von Protoonkogenen resultieren (Sengstag 1994). Diese Mutationen haben als Ursache die mitotische nicht homologe Rekombination, d.h. den Austausch zwischen nicht homologen DNA Regionen (Gupta, Sahota et al. 1997).

Die Destabilisierung dieser Gene könnte durch preexistierende Rekombinationshotspots oder die Herstellung von de novo Hotspots durch die Chromosomenumlagerung selbst erklärt werden. Regionen werden als Hotspots, d.h. bevorzugte Stellen für die Einleitung der

Rekombination, bezeichnet, wenn deren Rekombinationsfrequenz per Distanzeinheit mehr als 1 centi Morgan (cM) per Megabase (Mb) DNA beträgt (Lichten and Goldman 1995).

Die genetische Rekombination wurde in den letzten Jahrzehnten am besten an Bakterien und Hefen untersucht. Bei den *E. coli* Bakterien wurde herausgefunden, dass die Rekombinationsfrequenz strangaufwärts (am 5'Ende) der Sequenz 5'-GCTGGTGG-3' erhöht ist. Die Frequenz ist grösser nah an der Sequenz und nimmt exponentiell ab um einen Faktor von 2 für jede 2-3 Kb die man sich vom 5'Ende entfernt.

Diese Sequenz ist auch als Chi bekannt, was für "cross-over hotspot instigator" steht, also "Rekombinationsspot Förderer". Diese Chi Sequenzen sind in sogenannten Rekombinationsinseln eingebettet, die GT reich und ungefähr 800 bp lang sind. Neuere Untersuchungen (Tracy, Chedin et al. 1997) schlagen vor, dass diese 8 bp Sequenz länger ist, nämlich 5'-C(T) GCTGGTGGC(T)GG-3' und dass sie eventuell auch in der Transkription eine Rolle spielt (Bell, Chow et al. 1998).

Untersuchungen bei Eukaryonten haben gezeigt, dass ähnliche Sequenzen auch hier die Rekombination stimulieren. Ein Beispiel dafür findet man bei den molekularen Ereignissen, bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML). Bei der Pathogenese der Erkrankung spielt eine spezifische Translokation in weissen Blutzellen, eine reziproke Translokation von Stücken zwischen den Chromosomen 9 und 22, die zu einem verkürzten Chromosom 22 führt, dass als Philadelphia-Chromosom bekannt geworden ist, eine wichtige Rolle. Als Resultat der Translokation fanden Molekularbiologen eine Verschmelzung des ABL Gens von Chromosom 9 mit einem Gen auf Chromosom 22. Die Region der Fusion der beiden Genen hat den Verlegenheitsnamen BCR (Breakpoint cluster Region) bekommen. Die Sequenzanalyse der humanen ABL und BCR Genen und der Regionen, die in der Philadelphia chromosomalen Translokation involviert sind, haben gezeigt, dass Chi-ähnliche Oktamere (Sowerby, Kennedy et al. 1993; Chisoe, Bodenteich et al. 1995) in beiden Sequenzen vorkommen.

Zweites Beispiel ist ein chronischer B-Zelltumor (Jaeger, Karth et al. 1994), der als follikuläres Lymphom bezeichnet wird. Das pathogenetische Merkmal ist die chromosomale Translokation t(14;18)(q32;q21). Die Gene die hier verbunden werden, sind das Gen für die schweren Ketten des Immunglobulins (IgH) auf dem Chromosom 14 und das Gen Bcl-2 auf dem Chromosom 18. Durch Studien wurde entdeckt, dass die Bcl-2 major (mbr) und minor (mcr) Bruchpunktregionen wie auch die entsprechenden Regionen des Gens der schweren Ketten des Immunglobulins Rekombinationssequenzen beinhalten, die grosse Ähnlichkeiten zur Chi Sequenz zeigen (Wyatt, Rudders et al. 1992).

Diese Überlegungen führten zur Konstruktion von zwei Primern, nämlich CHI und STARK.

Studien über die Mutationen des Mismatch Repair Gens hMSH2 (Marshall, Isidro et al. 1996), haben bei einer Person folgenden Befund ans Licht gebracht: Ein 553 bp Fragment der hMSH2 cDNA wurde deletiert und durch eine 36 bp Alu-Sequenz ersetzt, die grosse Homologie zur 26 bp langen Alukernsequenz aufwies und das GCTGG Motif beinhaltet, das Teil der prokaryotischen Chi-Sequenz ist. Aus dieser Alukernsequenz wurde der Primer CORE ausgewählt und konzipiert.

Andere Sequenzen, die chromosomale Rekombinationen begünstigen, sind repetitive Sequenzen (Korenberg and Rykowski 1988) wie z.B. die Short Interspersed Nucleic Elements (SINEs) und die Long Interspersed Nucleic Elements (LINEs).

Von den SINEs ist besonders ein Typ hervorzuheben, nämlich die Alu-Sequenzen. Das humane Genom beinhaltet 10^6 Kopien der Alu Wiederholungen, die in ungefähren Abständen von 4 Kb vorkommen. Sie sind 300 bp lang, vor 65 Millionen Jahren entstanden, werden nur in Primatgenomen gefunden, machen 5-10% des ganzen Genoms aus und weichen von einer Consensus-Sequenz ungefähr 13% ab. Es gibt Hinweise, dass eine positive Korrelation zwischen Gendichte und Aludichte existiert. In situ Hybridisierungsstudien haben gezeigt, dass Alu-Sequenzen vorwiegend in GC-reichen (56% GC), R (R für reverse) Banden der Metaphasenchromosomen lokalisiert sind, Regionen, die vorzüglich an homologen und nichthomologen chromosomalen Austauschprozessen teilnehmen. An einer Anzahl von krankheitsassoziierten Rearrangements und Deletionen sind Alu-Sequenzen ebenfalls beteiligt: mehrere Philadelphia-Chromosom BCR-ABL Translokation Bruchpunkte; eine Inversion-Deletion im α -Globin Gen; intragenomische Deletionen im Lysylhydroxylase Gen; LDL-Rezeptor Gen; Apolipoprotein α Gen; Adenosin Deaminase Gen (ADA-SCID); Complement Component C1 Gen.

Die besten Beispiele dafür sind das Low Density Lipoprotein Rezeptor Gen (Lehrman, Russell et al. 1987) und das Complement Competent 1 Inhibitor Gen (C1I) (Ariga, Carter et al. 1990). Diese Gene beinhalten eine grosse Anzahl von Alu-Elementwiederholungen und sind wahrscheinlich deshalb empfänglicher für Alu hergeleitete Genrekombinationen. Rüdiger et al. haben in einer Studie die Alu-Sequenzen, die bei Rekombinationen des LDL-Rezeptor Gens vorkommen, verglichen und vorgeschlagen, dass eine 26 basenpaarlange Kernsequenz(Coresequence) in den Alu-Elementen die Rekombination stimuliert, was die Ursache für das häufige Vorkommen dieser Elemente bei Genumordnungen sein könnte.

Deletionen, die durch Alu-Elemente vermittelt werden, kommen auch häufig bei Genen vor, die in der Krebsentwicklung eine Rolle spielen, wie z.B. das Mismatch Repair Gen hMLH1, das NF-1 Gen und das Brustkrebsgen BRCA 1. Es konnte gezeigt werden, dass Alu vermittelte Rekombination für das Auftreten einer 165 bp Deletion in der cDNA des hMLH 1

(Nystrom-Lahti, Kristo et al. 1995) Gens verantwortlich war. Diese Mutation, die durch die Alu Sequenzen im Intron 15 und 16 vermittelt wurde, kann zum Hereditären-Nicht-Polypösen-Colon-Ca (HNPCC) führen.

Das NF-1 Tumorsuppressorgen (Legius, Marchuk et al. 1993) wurde bei einem Patienten durch eine Deletion mit Neurofibromatose Typ I inaktiviert. Die Deletion entfernte 200 kb vom Chromosom 17 und wurde durch den Verlust von mehreren polymorphen Marker des 17.Chromosoms begleitet. Die Sequenzierung der Deletionsbruchpunkte zeigte, dass die Ursache dafür eine Rekombination zwischen tetrameric short tandem repeats waren, die wiederum durch zwei Alu Wiederholungen flankiert wurden.

In einer grossen Familie mit Brustkrebs und Ovarialkrebsbelastung wurde eine 1 kb Deletion festgestellt, die das Exon 17 des BRCA 1 Gen beinhaltet und die auf ein genomisches Rearrangement zwischen Alu Sequenzen zurückgeht (Puget, Torchard et al. 1997).

Die BRCA 1 (Smith, Lee et al. 1996) Gensequenz beinhaltet zu 46,3% repetitive Elemente. Ausserdem hat ein Vergleich gezeigt, dass es bis jetzt nur 3 bekannte Gene gibt, die eine höhere Alu Dichte aufweisen: das Apolipoprotein-Gen C-1 mit 60,8%, das Blym transforming Gen mit 53,7% und das Apolipoprotein C-IV Gen mit 41,3%. Im BRCA 1 Gen wurden auch 19 der vorher genannten Alukernsequenzen (Coresequence) gefunden.

Die Feststellung, dass die Alu-Elemente eine Rolle in der Förderung von nicht homologen Rekombinationen spielen, die zu Keimbahndeletionen und -duplikationen in einer Anzahl von Genen führt, erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Gene mit höherer Frequenz an Alu Sequenzen auch auffälliger sind gegenüber somatischer Mutationen. Diese ist eine mögliche Erklärung für den sporadischen Brustkrebs (Smith, Lee et al. 1996) und auch für andere Erkrankungen mit einer Neoplasieprädisposition z.B. die Fanconi Anämie (Levrin 1998).

Die Alu Sequenzen vermitteln also die chromosomalen Rearrangements indirekt, entweder durch die Förderung der Misspaarung und illegitimer Rekombination von nonhomologe Alu reichen Regionen oder durch die Formation von inter- oder intrachromosomalen Hairpinloop Strukturen, die DNA chromosomale Translokationen und Deletionen fördern. Der Primer R12A/267 für die Amplifikationen beinhaltet Teil der Consensus Alu Sequenz (Munroe 1996). Es bestehen weitere Hinweise, dass eine vergleichbare Funktion mit der Alu-Elemente auch die L1-Elemente der LINEs ausüben. Die L1 Elemente der Primaten (Korenberg and Rykowski 1988) befinden sich vorwiegend auf den G/Q (Giemsa oder Quinacrine) Banden der Metaphasenchromosomen, die GC-arm (GC-Gehalt 42 %) und genarm sind. Sie sind länger als 5Kb und ihre Anzahl beträgt mehr als 10^4 Kopien pro Primatengenom. Die Alu und die L1 Sequenzen sind also in umgekehrter Weise im menschlichen Genom verteilt. L1 vermittelte Genrekombinationen wurden in mehreren Erkrankungen festgestellt: z.B. a) eine 300 kb Deletion im Intron 10 des PAX Gens in der familiären Aniridie, b) eine Translokation

im Intron 24 des COL 5A Gens im Ehlers-Danlos Syndrom, c) eine 7,1 Kb L1 Element Insertion im Intron 6 der α -Untereinheit des Glycin-Rezeptors in der kongenitalen Myoklonie. Die Verbindung des L1 Elements mit DNA Deletionen in Krebszellen wurde zum ersten Mal von Inoue (Inoue, Ishii et al. 1997) beobachtet; L1-Elemente vermitteln häufige Deletionen im FRA3B/FHIT Locus mit folgender Inaktivierung des FHIT Gens. FRA3B ist eine fragile Stelle (fragile site) also eine chromosomale Region, die zytogenetisch detektierbare Lücken nach bestimmter Chemikalienexposition (z.B. Aphidicolin) der Zellen aufweist und auf dem 3p14.2 die im FHIT (Fragile Histidine Triad) Gen lokalisiert ist. Auf der Basis der Sequenz von L1 Elementen ist der Primer L1HS entstanden (Munroe, Haas et al. 1994).

Vergleichbare Analysen von diskreten genetischen Loci zwischen Primaten weisen auf die Fähigkeit des Genoms der höheren Primaten, genreiche genomische 5 bis 50 Kb lang Segmente zu duplizieren oder ihre Transposition in die perizentromerische Regionen unterschiedlicher Chromosomen zu fördern (Eichler 1999). Der Begriff perizentromerisch bezieht sich auf eine grosse Zone beidseits des Zentromers, die direkt distal der α -Satelliten Wiederholungen beginnt und bis zur ersten zytogenetisch Giemsa gefärbten Bande reicht.

Mit den Duplikationen ist oft eine Bewegung von Material zwischen nicht homologen Chromosomen verknüpft, die durch intrachromosomale Ereignisse gefolgt werden, welche Kopien auf eine nicht-tandem Art verteilen. Der Abstand zwischen den Duplikaten kann 1-3 Mb ertragen. Obwohl der Duplikatmechanismus nicht bekannt ist, gibt es Vorschläge, dass mehrere repetitive Sequenzen in diesen Regionen die Duplikationen fördern.

Als Beispiel werden hier die ss-Satelliten genannt, dessen Fähigkeit zur schnellen Expansion und Kontraktion bekannt ist, wahrscheinlich über Mechanismen, wie saltatorische Replikation oder unequal crossing over. Wenn Krüppel-assoziierte BOX Zinc Finger (KRAB-ZNF) Gene nahe an ss-Satelliten Wiederholungen integriert werden, DNA beginnen sie sich zu duplizieren, indem sie durch diese ss-Satelliten Matrix getragen werden, die ständig in Fluss ist (Eichler, Hoffman et al. 1998). Die Präsenz von inverted ss-Satelliten Blöcken, die das ZNF Gen flankieren, fördert weiter die Duplikation. Es konnte gezeigt werden, dass solche grosse Palindrome die Genamplifikation fördern und dass sie auch mit anderen Cluster von duplizierten Genen assoziiert sind. Es ist auch wahrscheinlich, dass andere repetitive Sequenzen an solchen Mechanismen beteiligt sind.

Interessant ist, dass grosse genomische Segmente von paralogen Sequenzen (Sequenzähnlichkeit aufgrund von Duplikation) auf beiden Seiten von Bruchpunkt Cluster bekannter Mikrodeletion / Mikroduplikation Syndrome, wie das Prader-Willi Syndrom (PWS) in 15q11-13 und das Smith-Magenis-Syndrom (SMS) in 17p11.2, entdeckt wurden, was auf ihre Rolle in der Vermittlung aberranter Rekombinationen mit assoziierter Instabilität dieser Regionen hinweisen könnte. Perizentromerische Regionen tendieren also zur genomischen Instabilität und zwei von diesen Intervallen, 15q1.2 und 22q11 gehören zu den unstabilsten

Regionen des humanen Genoms (Eichler 1998). Diese Regionen sind häufig mit sporadischen Duplikationen und Deletionen assoziiert und werden deshalb auch als Hotspots angesehen. Der Grund dafür sind die Präsenz von grossen Blocks von paralogen Sequenzen, die durch Satelliten DNA flankiert werden.

Die DNA des Zentromers beinhaltet hintereinanderliegende repetitive Sequenzen, sogenannte Satelliten DNA und im niedrigeren Masse interspersed repetitive DNAs, also SINEs und LINEs (Kalitsis 1997). Es konnten mehrere Satelliten DNA Familien ausgemacht werden. Familie 1 besteht aus 42 bp Wiederholungen, die durch alternierende 17 bp und 25 bp Einheiten gebildet werden. Familie 2 wird aus ATTCC Wiederholungen zusammengestellt. Die Satelliten DNA Familie 3 wird auch aus dem Pentamer ATTCC/GGAAT zusammengestellt, dessen Reihenfolge manchmal durch eine spezifische 10 bp-Sequenz unterbrochen wird (Lee, Wevrick et al. 1997). In der Satelliten-3-DNA finden auch chromosomale Rearrangements statt, die zu Robertsonian Translokationen führen. Die Hypothese besagt, dass Guanin-reiche Satelliten 3 Wiederholungen die chromosomale Rekombination durch Formation von Tetraplex Strukturen fördern. Eine weitere Familie ist die der alpha Satelliten DNA. An der Grenze zwischen alpha und Familie 3 Satelliten DNA finden sich auf den Chromosomen 13, 14 und 21 direkte repetitive Sequenzen, die als Bindungsstelle für das Protein pJa fungieren sollen. Aus dieser repetitiven Sequenz wurde der Primer C4 konzipiert.

An dieser Stelle wäre zu erwähnen, dass die SINEs, hauptsächlich die Alu-Sequenzen, im Zentromer ungefähr 50-fach im Vergleich zum übrigen Genom unterrepräsentiert sind. Diese Unterrepräsentierung betrifft auch die LINEs Sequenzen, z.B. die Kpn Familie.

Andere als Rekombinationshotspots vorgeschlagene Sequenzen sind die Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs) also die Minisatelliten und die Mikrosatelliten. Die Minisatelliten DNA besteht aus Kopien von DNA-Abschnitten aus 16-64 Basenpaaren, die im Genom verstreut sind, aber gehäuft im subtelomeren Bereich vorkommen. Mikrosatelliten bestehen aus 10-50 Kopien von sehr einfachen Sequenzwiederholungen, wie die am häufigsten vorkommende (A)_n oder die zweithäufigste (CA)_n, wobei n 10 bis 60 Basen beträgt. Die Mikrosatelliten sind zufällig im Genom verteilt, hochgradig polymorph und liegen in sehr grosser Anzahl vor (z.B. wird geschätzt, dass die CA-Sequenz in 10000 bis 50000 Kopien vorhanden ist) (Eshleman and Markowitz 1995).

Es gibt Hinweise, dass die hypervariable Minisatelliten-DNA und die (GT)_n Mikrosatelliten als Rekombinationshotspots der Gene der menschlichen HLA-DQ Oberflächenantigene fungieren. Interessant ist, dass manche DNA-Sequenzen wie die Mikrosatelliten (CG)_n und (TG)_n, eine strukturelle Veränderung vor der üblichen rechtsgängigen B-DNA Helix zur linksgängigen Z-DNA Form durchmachen können. Die Hotspotaktivität des (GT)_n Motifs im Z-DNA Bereichs, wurde zum ersten Mal als Erhöhung der intramolekularen Rekombination

zwischen $2(TG)_n$ Wiederholungen von replizierenden SV40 Viren in Affenzellen (Wahls 1998) festgestellt. Rekombinationen zwischen Nukleotidwiederholungen der Z-DNA-Form sind 8-mal häufiger als die zwischen anderen Mikrosatelliten.

Dass GT-reiche Loci eine spezielle Rolle in der Rekombination spielen, es lässt sich sowohl auch durch das Verhalten von Mikrosatelliten DNA als auch durch das der interstitiellen telomerischen Sequenzen schliessen. Die konstanten Teile der schweren Ketten der Immunglobuline unterliegen Rearrangements mittels homologen Rekombinationen von Regionen (switch-Loci) die GT-reich sind. Zusätzlich ist zu erwähnen dass das Hefeprotein Rad 51, ein REC-A-Homolog eine ähnliche Präferenz für GT-reiche Sequenzen aufweist. Diese Tatsachen sind eventuell ein Hinweis dafür, dass GT-reiche Regionen universell benutzt werden, um Rekombinationen zu stimulieren.

Die genaue Rolle der VNTRs im Mechanismus der Rekombination ist unklar. Es wurde vorgeschlagen, dass sie als Hotspots agieren, in dem sie als Auflösungspunkte für die Holliday Junctions fungieren (Wahls 1998).

Nuernberg et. al. (Nuernberg 1991) konnte bei Hirntumoren mittels Hybridisierung mit einer $(GTG)_5$ Sonde amplifizierte Fragmente nachweisen, was auch nach Rehybridisierung mit der $(GT)_8$ Sonde im Gegensatz zur vergleichenden Leukozyten DNA gelang. Da das EGFR-Gen bei diesen Tumoren ebenfalls amplifiziert ist, versuchte er mittels Southern-Technik den Zusammenhang zwischen beiden amplifizierten Regionen, des Gens und des GT-Bereiches zu zeigen. Nach vergleichender Hybridisierung und Berücksichtigung der Genrestriktionskarte lokalisierte er interessanterweise den Bereich im EGFR-Gen zwischen Exon 5 und Exon 7, also im 5. oder 6. Intron.

Solche Mikrosatelliten wie $(GT)_n$ sind auch in anderen Genen anzutreffen wie z.B. im BCR-Gen, wo es beginnend von Position 74.381 21 mal wiederholt wird (Chissoe, Bodenteich et al. 1995).

Unterschiedliche Mikrosatelliten, nämlich Wiederholungen von 22 einfachen Sequenzen (SSRs = Single Sequence Repeats, eine andere Bezeichnung für Mikrosatelliten) wie z.B. $(CGT)_7$, $(TA)_5$, $(CTTTT)_2$, $(GT)_{23}$, die mindestens 10 Nukleotide lang sind, findet man auch im BRCA 1 Gen (Smith, Lee et al. 1996). Nach Mikrosatellitensequenzen wurden die Primer EP2, EP5, EP6 und EP7 konzipiert.

Die Enden der enkaryotischen Chromosome (Telomere) sind durch eine Anordnung von repetitiven Sequenzen charakterisiert. In Menschen und Mäusen ist TTAGGG die wichtigste repetitive Einheit mit einer Orientierung $5' \rightarrow 3'$ in Richtung auf das Ende des Chromosoms (Blackburn 1991). Im Menschen erstrecken sich diese Wiederholungen über 10-15 kb, während sie in der Maus mit 30-150 kb erheblich länger sind. Telomer ähnliche Sequenzen

(Telomere-like Repeats = TLRs genannt) sind auch in bestimmten interstitiellen chromosomalen Stellen anzutreffen. Das menschliche Chromosom 2 z.B., beinhaltet mindestens ein TLR auf der q13 Bande (JW, Baldini et al. 1991). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese TLRs durch eine Kopf-zu-Kopf Anordnung der TTAGGG Sequenz zustande kommt, d.h. 5'-(TTAGGG)_n-(CCCTAA)_n-3'. Aufgrund dieser Daten wurde vorgeschlagen, dass dieser Locus eine Stelle einer älteren Telomer-Telomer Fusion darstellt. Aus dieser Kopf-zu-Kopf Anordnung ergab sich der Primer TELO3.

Hastie und Allshire (Hastie and Allshire 1989) haben vorgeschlagen, dass diese interstitielle TLRs an den chromosomalen fragilen Stellen (fragile sites) vorhanden sind. Die fragile Stelle FRAXA (Xq27.3) hat eine einfache repetitive Struktur; sie besteht aus der wiederholenden (CCG)_n Einheit, die nicht telomer-ähnlich ist. Die fragile Stelle FRA2B, lokalisiert auf 2q13, beinhaltet auch keine TLR Sequenzen wie in situ Hybridisierungen gezeigt haben.

Trotz dieser Tatsachen konnte gezeigt werden, dass eine Einführung von ~500 bp TLR Sequenzen an eine interstitielle Stelle von Säugetierchromosomen zu einer erhöhten Frequenz von spontanen Brüchen an der Integrierungsstelle führen kann. Kopf-zu-Kopf Anordnungen von Telomersequenzen die interstitiell in Hefechromosomen anwesend sind, zeigen eine hohe Bruchfrequenz und im Paramecium(ein Ziliat) interstitielle Telomersequenzen sind Hotspots für illegitime Rekombinationen.

Während die fragilen Stellen in der Entwicklung der menschlichen Leukämie wahrscheinlich auch involviert sind, gibt es mehr Hinweise in diesem Zusammenhang in der Maus. Eine Anzahl von Radio-sensitiven Stellen (RSS = Radiatio-sensitive sites) wurden auf dem Chromosom 2 von Knochenmarkzellen der CBA/H Maus gefunden, ein Stamm der als Modell für die Radiatio-verursachte akute myeloische Leukämie (AML) fungiert (Silver and Cox 1993). Die erhöhte Frequenz der induzierten Rearrangements in den RSS des Chromosoms 2 und terminalen Regionen anderer Chromosome suggeriert die Anwesenheit von interstitiellen TLR Sequenzen an den RSS. In situ Hybridisierungen konnten zeigen, dass die RSS auf dem Chromosom 2 durch eine Fülle von TLRs charakterisiert werden.

Es gibt starke Hinweise von in vitro Studien, dass Telomersequenzen die Formation von Komplexen DNA-Strukturen fördern können, die von einer Verbindung /Paarung von 4 Guanin-Basen ausgehen (bilden ein sogenanntes G-Quartet), die nicht die Watson-Crick Regel befolgen (Bouffler, Silver et al. 1993).

Solche vorübergehenden Strukturen wurden als Stellen von chromosomalen Rekombinationen vorgeschlagen. Die Anwesenheit von interstitiellen Telomersequenzen wurden an den Bruchpunktverbindungspunkten (Junctions) von strukturell abnormalen Chromosomen festgestellt. Die Rekombinationsereignisse, die die CAD Genamplifizierung in chinesischen Hamsterzellen begleiten, involvieren häufig TTAGGG-Wiederholungen.

Vor kurzem wurde ein Fall von AML mit einer springenden Translokation (jumping translokation) registriert, die einen Bruchpunkt am 11q23 aufweist (Cuthbert, McCullough et al. 1999). FISH demonstrierte Triplikation des MLL Gens und die Anwesenheit von interstitiellen Telomersequenzen, was die Rolle der repetitiven Sequenzen im Mechanismus der springenden Translokationen unterstützt.

Krawczak und Cooper (Krawczak and Cooper 1991) haben Ähnlichkeiten zwischen Deletionen untersucht und eine Konsensussequenz TGA/GA/GG/TA/C ausgemacht (diese Sequenz war die Basis für den DH Primer), die in Deletionshotspots von 5 humanen Genen (AT3, F8, HBA, HBB und HPRT) vorkam. Diese Sequenz trafen die Genetiker ausserdem in der Nähe von ungefähr die Hälfte der untersuchten 60 sporadischen Deletionen von verschiedenen Genen an. Sie wurde häufig an Orten von spontanen Deletionen im Hamster ARPT Gen gefunden, konnte mit mehreren grossen Deletionen/Translokationen von humanen Genen assoziiert werden, agiert während der DNA Replikation als Hemmungsorte für die humane Polymerase alpha und konnte durch in vitro Studien dieser Polymerase als anfällig für Frameshift Mutationen charakterisiert werden.

Es ist seit längerem bekannt, dass Deletionen in mitochondrialen Genomen bei allen Patienten mit Kearns-Sayre Syndrom (KSS) und in ungefähr der Hälfte der Patienten mit progressive externe Ophthalmoplegie (PEO) vorkommen. Die Deletionen unterscheiden sich sowohl in Grösse als auch in ihre Lokalisation, ausser einer 5 kb langen, die wiederum in mehr als ein Drittel aller Patienten vorkommt (Schon, Rizzuto et al. 1989). Diese häufige Deletion wird in normalen mitochondrialen Genomen von einer 13 Basenpaar lange perfekten direkten Repetition flankiert. Diese Beobachtung deutet an, dass die homologe Rekombination, die bei Pflanzen und niederen Eukaryonten hauptsächlich aktiv ist, auch in Säugergenome stattfindet und dass sie eine der Ursachen ist für Deletionen dieser beiden mitochondrialen Myopathien. Aus dieser 13bp langen Sequenz wurde der MHS Primer konstruiert.

Es wurden weitere Primer gebildet, die sich an der Exon-Intron-Grenze Sequenz (Mount 1982) anlehnen, mit unterschiedlichen GC% Gehalt, sowie ein Primer, der sich an der TATA-Box orientiert.

Stone und Wharton (Stone and Wharton 1994) haben 1994 eine Modifizierung der "RNA Fingerprinting" Methode benutzt, um differentiell exprimierte oder angereicherte cDNA Fragmente von spezifischen Genfamilien zu identifizieren. Die Technik wurde erfolgreich bei Säugertierzellen angewandt, um neue Mitglieder der SER/THR Protein Kinase Familie und der Zinc Finger Protein Familie zu entdecken. Aus den dort beschriebenen Primer wurde der Zn ausgesucht.

Die Sequenzen der benutzten Primer stehen in der Tabelle 2. Zusätzlich wird da festgehalten, ob ein Primer Banden produziert und ob er informativ ist, d.h. ob er Unterschiede zwischen Mammatumor- und Leukozyten DNA aufdecken kann.

Tabelle 2:

Primer	Name	Sequenz (5'=> 3')	PCR-Produkte	Unterschiede/ informativ
1	CHI	GTG GGG AGG ACG	-	-
2	STARK	TGC TGG TGG TGG	-	-
3	EP 2	GAT AGA TAG ATA	+	-
4	EP 5	GAA GAA GAA GAA	+	-
5	EP 6	ACG ACG ACG ACG	+	+
6	EP 7	TGT CTG TCT GTC	+	-
7	TELO 3	TTA GGG CCC TAA	-	-
8	ACR 3	TTT CTC CAG G	+	+
9	DCR 4	GAA CTT ACC T	+	+
10	C 4/ PJa	GGT GAA AAA G	+	-
11	CORE	CCA AAG TGC TGG	-	-
12	R 12 A/ 267	AGC GAG ACT CCG	+	-
13	TATA	GGG CTA TAA G	+	+
14	Zn	GTC GTC GAA TTC CAC ACA GGA GAA AAG CC	+	
15	Zn + CORE		-	-
16	Zn + DCR4		+	+
17	Zn + R 12 A/ 267		-	-
18	Zn + ACR3		+	+
19	Zn + TELO3		+	-
20	Zn + DH		Schmier	-
21	TATA + R 12 A/ 267		+	+
22	ACR 3 + DCR 4		+	-
23	EP 7 + ACR 3		+	-
24	C 4/ PJA + ACR 3		+	-
25	C 4/ PJA + DCR 4		+	+
26	CHI + TELO 3		+	+
27	CORE + TELO 3		+	+
28	STARK + ACR 3		+	+
29	STARK + DCR 4		+	+
30	STARK + EP 2		-	-
31	STARK + EP 6		+	+
32	STARK + R 12 A /267		+	+
33	STARK + TELO 3		+	+
34	STARK + C 4		-	-
35	DH + ACR 3		+	+
36	DH + DCR 4		+	+
37	DH + EP 2		+	+
38	DH + EP 6		+	+
39	DH + R 12 A /267		+	+
40	DH + TELO 3		-	-
41	DH + C 4		+	+
42	DH + MHS		+	+
43	L1HS + MHS		+	-
44	L1HS + STARK		-	-

Aus den durchgeführten Experimenten lässt sich ableiten, dass eine Primersynthese, die sich nach bekannten und tumorrelevanten Sequenzen richtet, keine Garantie für die Entdeckung von Unterschieden zwischen Genomen ist. Primer, die z.B. nach der Exon-Intron Grenze Sequenz oder die nach den Alu Elementen synthetisiert worden sind, haben beim Vergleich von Tumor- mit gesundem Gewebe beim Mammacarcinom zu keinem Erfolg geführt. Dagegen haben Primer mit telomeraseähnlichen Sequenzen oder Primer mit Sequenzen vergleichbar der des "Chi" Elements oder mancher Mikrosatelliten eine grössere Fähigkeit gezeigt, Differenzen aufzudecken.

6.13 Dynamamin

Dynamamin ist wegen seiner Grösse (ein Homotetramer von 100kDa Untereinheiten), seiner niedrigen Affinität zu GTP (30µM) und seiner hohen intrinsischen und stimulierten Rate der GTP Hydrolyse ein eher untypisches Mitglied der GTPase Superfamilie (Schmid 1998). Untypisch ist weiter, dass Moleküle mit unterschiedlichen Funktionen mit Dynamamin am Carboxylende des Proteins interagieren, entweder über die PH (Pleckstrin Homologie) Domäne oder die RP (Prolinreiche) Domäne, und seine GTPase Aktivität regulieren können wie z.B. Mikrotubuli, Phospholipidvesikel, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphathaltige Phospholipidvesikel, SH3 (Src Homologie 3 Domäne)-haltige Proteine, wie die Phospholipase C gamma, das wachstumsfaktorrezeptorgebundene Protein 2 (Grb2), die regulatorische Untereinheit der phosphatidylinositol-3-Kinase (p85) und die beta/gamma Untereinheiten der dreiteiligen G-Proteine.

Die Interaktion des Dynamamins mit Proteinen dieser Art weist auf seine Involvierung in der Signaltransduktion mittels Tyrosinkinaserzeptoren hin (Urrutia, Henley et al. 1997). Diese Hypothese wurde durch die Immunpräzipitation mit einer Anzahl von Tyrosinkinasewachstumsfaktorenrezeptoren einschliesslich des EGF Rezeptors unterstützt. Zusätzlich konnte Scaife et al. (Scaife and Margolis 1990) zeigen, dass die Verbindung des Dynamamins mit der Phospholipase C gamma weiter zunimmt, wenn eine Wachstumsfaktorstimulation stattfindet. Diese Resultate sind ein Hinweis dafür, dass Dynamamin evtl. in unterschiedlichen Signalkaskaden als Antwort auf Stimulationen durch unterschiedliche Agonisten ist. Diese Hypothese wird zusätzlich von der Tatsache unterstützt, dass mindestens drei Dynamamingene mit mehreren Splice Varianten existieren. Dies führt unweigerlich zur Frage, wieso es so viele Formen gibt und ob sie einzigartige oder redundante Zellfunktionen übernehmen.

Obwohl die Funktion der Dynamaminproteine in den Signalwegen unklar ist, kann man von den bisher bekannten Daten mit Sicherheit sagen, dass diese GTPase eine wichtige Rolle in der

clathrinvermittelte Endozytose und im Recycling der synaptischen Vesikel spielt (Schmid 1998).

Die hier beschriebene Amplifikation der Dynaminsequenz in Mammakarzinomproben könnte ein Hinweis für seine Involvierung in der Karzinogenese sein. Unseres bisheriges Wissen über dieses Molekül und ganz speziell seine Interaktionen in der Signaltransduktionskaskaden ist aber völlig unzureichend, um seine Rolle zu konkretisieren.

Die Amplifizierung kann auch ein Zeichen dafür sein, dass in der Nähe des Dynamins auf dem Chromosom 9q34 sich ein oder mehrere Gene befinden, die unmittelbar an der Tumorgenese teilnehmen. Amplifikationen der Region 9q34 in Mammakarzinomen sind schon beschrieben worden, aber, da sie mit der CGH (Komparative Genomische Hybridisierung) nicht detektiert wurden, sondern durch die Chromosomendisektion, geht man davon aus, dass sie sich auf niedrigem Niveau bewegen (Guan, Meltzer et al. 1994). Tatsächlich ist es so, dass das Dynamin I Gen auf einem Abschnitt des Chromosoms 9 (Newman-Smith, Shurland et al. 1997) lokalisiert ist, der sehr intensiv studiert wird. Eine grosse Anzahl von Genen wurde dieser Region zugeordnet: Gelsolin, Argininosukzinat, Adenylatkinase, ABL Onkogen, AB0 Blutgruppe und Tenaszin. Zusätzlich zu den Translokation des ABL in der chronischen myeloischen Leukämie sind hier zwei Neuropathien aufgezeichnet: die tuberöse Sklerose (TSC1) und die idiopathische Torsionsdystonie. Die neurologischen Komponenten dieser Erkrankungen sind vereinbar mit Mutationen des Dynamin I Gens, weil Dynamin so wichtig für die synaptische Transmission ist. Darüber hinaus gibt es Daten, die die Hypothese stützen, dass das TSC1 als Tumorsuppressorgen für das Urothelkarzinom fungieren kann (Hornigold, Devlin et al. 1999). Abschliessend kann man wohl sagen, dass die Nachbarschaft des Dynamin I Gens eine hochinteressante Region ist und zwar nicht nur für das Mammakarzinom. Es muss jedoch noch erhebliche Arbeit geleistet werden, um ihre Rolle in der Tumorgenese zu klären.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendung der Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Methode, die auf einer PCR-Technik basiert, bei Tumorgeweben. Zunächst wurde dabei die Reproduzierbarkeit dieser Methode überprüft und versucht, die Technik so zu optimieren, dass ein möglichst vollständiges Screening des Genoms auf DNA-Gewinne oder Verluste in einem Bereich von 0 bis 4Kb, durchgeführt werden konnte. Diese Optimierung konnte durch systematische Veränderungen der Temperaturprofile, Reagentien, Konzentrationen und Gerätewahl sowie durch Kontaminationsuntersuchungen erreicht werden. Mit der optimierten Methode wurde native Mammacarcinom-DNA mit korrespondierender Leukozyten-DNA verglichen. Hierzu kamen speziell ausgewählte Primer zum Einsatz, die auf der Basis von tumorrelevanten Sequenzen konzipiert wurden. Die differenten Banden der RAPD-Profile wurden anschliessend weiter charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei allen sechs untersuchten Tumoren Abschnitte des Dynamin-I-Gens amplifiziert vorliegen.

8 AUSBLICK

Wie in der Einleitung beschrieben, können als Genomunterschiede zwischen gesundem und Tumorgewebe Deletionen, Insertionen und Amplifikationen vorkommen und mit der RAPD nachgewiesen werden. Die Banden, die den Unterschied zwischen den entsprechenden Bandenmuster ausmachen, werden sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen können mit den bestehenden Daten in den Genbanken auf Homologie verglichen werden. Wenn die Sequenzsuche negativ verläuft, könnten mittels Computeranalyse mögliche kodierende Regionen auf den Sequenzen festgestellt werden.

Sind die Sequenzen in den Genbanken nicht vorhanden, erfolgt die Chromosomenlokalisierung. Dazu bieten sich Methoden an:

1. Methode: Die in situ Hybridisierung bei der markierte Fragmente DNA oder RNA gegen humane Chromosome hybridisiert werden.
2. Methode: Als zweite Möglichkeit kommt die Southern-Technik in Betracht. Hierzu wird die DNA käuflich erworbener Mensch/Hamster-Fusionszellen, die mindestens ein menschliches Chromosom erhalten, isoliert und mit Restriktionsendonucleasen gespalten.

Einzelbasensubstitutionen sind jedoch mit der RAPD-Methode nicht detektierbar. Im Prinzip könnten die Einzelbasensubstitutionen, die in den RAPD-Banden vorhanden sind, mit der Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) Analyse festgestellt werden. Wenn man aber in Betracht zieht, dass die SSCP Sensitivität über 50 % bei Molekülen kleiner als 500 Gp beträgt und dass je grösser das Fragment desto schlechter die Auflösung ist, muss man feststellen, dass Erkenntnisse nur über einen kleinen Bereich des Bandenspektrums gewonnen werden können.

9 ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die bei der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Untersuchungen genomischer Veränderungen von Mammakarzinomzellen mittels RAPD“
in der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover und in der Abteilung Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie der Charité, Campus Berlin-Buch in der Zeit von 1994 bis 1999 unter Betreuung von Herrn Professor Dr. H. Poliwoda, Herrn Professor Dr. W.-D. Ludwig und Herrn Dr. Th. Benter ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel abnutzt habe. Meine Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzte Literatur habe ich vollständig angegeben. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Berlin, den

10 LITERATUR

- Achille, A., M. O. Biasi, et al. (1996). "Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma." *Cancer Res* **56**(16): 3808-13.
- Akopyanz, N., N. O. Bukanov, et al. (1992). "DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting." *Nucleic Acids Res* **20**(19): 5137-42.
- Ariga, T., P. E. Carter, et al. (1990). "Recombinations between Alu repeat sequences that result in partial deletions within the C1 inhibitor gene." *Genomics* **8**(4): 607-13.
- Arribas, R. (1997). "Assessment of genomic damage in colorectal cancer by DNA fingerprinting:prognostic applications." *Journal of clinical oncology* **15**(10): 3230-3240.
- Barlow, D. P. (1992). "DNA Isolation for PFGE." *Methods in Molecular Biology: Pulsed Field Gel Electrophoresis*(Edited by Burmeister,M. and Ulanovsky,L.), Humana Press, Totorra ,NJ **12**: 111-112.
- Baskaran, N., R. P. Kandpal, et al. (1996). "Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content." *Genome Res* **6**(7): 633-8.
- Bell, D. A. and D. M. DeMarini (1991). "Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments." *Nucleic Acids Res* **19**(18): 5079.
- Bell, S. J., Y. C. Chow, et al. (1998). "Correlation of chi orientation with transcription indicates a fundamental relationship between recombination and transcription [published erratum appears in *Gene* 1999 Apr 29;231(1-2):213]." *Gene* **216**(2): 285-92.
- Bishop, J. M. (1995). "Cancer: the rise of the genetic paradigm." *Genes Dev* **9**(11): 1309-15.
- Blackburn, E. H. (1991). "Structure and function of telomeres." *Nature* **350**(6319): 569-73.
- Bouffler, S., A. Silver, et al. (1993). "The role of DNA repeats and associated secondary structures in genomic instability and neoplasia." *Bioessays* **15**(6): 409-12.
- Burckhardt, J. (1994). "Amplification of DNA from whole blood." *PCR Methods Appl* **3**(4): 239-43.
- Caetano-Anolles, G., B. J. Bassam, et al. (1991). "DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers." *Biotechnology (N Y)* **9**(6): 553-7.
- Carninci, P., Y. Nishiyama, et al. (1998). "Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 520-4.
- Cease, K. B., C. A. Potcova, et al. (1994). "Optimized PCR using Vent polymerase." *PCR Methods Appl* **3**(5): 298-300.

- Chester, N. and D. R. Marshak (1993). "Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction." *Anal Biochem* **209**(2): 284-90.
- Chisoe, S. L., A. Bodenteich, et al. (1995). "Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation." *Genomics* **27**(1): 67-82.
- Comes, A. M., Humbert, J.F., Laurent, F. (1997). "Rapid cloning of PCR-derived RAPD probes." *Biotechniques* **23**(2): 210-212.
- Cuthbert, G., S. McCullough, et al. (1999). "Jumping translocation at 11q23 with MLL gene rearrangement and interstitial telomeric sequences." *Genes Chromosomes Cancer* **24**(4): 295-8.
- D'Aquila, R. T., L. J. Bechtel, et al. (1991). "Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating." *Nucleic Acids Res* **19**(13): 3749.
- de Juan, C. (1999). "DNA amplification on chromosome 6p12 in non-small-cell-lung-cancer detected by arbitrarily primed polymerase chain reaction." *International Journal of cancer* **84**: 344-349.
- Deb, P. (1999). "Search for retroviral related DNA polymorphisms using RAPD PCR in Schizophrenia." *Biochimica et Biophysica Acta* **1453**: 216-220.
- Dil, A., A. Misra, et al. (1998). "Genetic alterations in brain tumors identified by RAPD analysis." *Gene* **206**(1): 45-8.
- Dooley, J. J., S. P. Harrison, et al. (1993). "Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium* isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles." *Can J Microbiol* **39**(7): 665-73.
- Douglas, A. and B. Atchison (1993). "Degradation of DNA during the denaturation step of PCR." *PCR Methods Appl* **3**(2): 133-4.
- Dweikat, I., Mackenzie, S., Levy, M., Ohm, H. (1993). "Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species." *Theor. Appl. Genet.* **85**: 497-505.
- Eichler, E. E. (1998). "Masquerading repeats: paralogous pitfalls of the human genome [published erratum appears in *Genome Res* 1998 Oct;8(10):1095]." *Genome Res* **8**(8): 758-62.
- Eichler, E. E. (1999). "Repetitive conundrums of centromere structure and function." *Hum Mol Genet* **8**(2): 151-5.
- Eichler, E. E., S. M. Hoffman, et al. (1998). "Complex beta-satellite repeat structures and the expansion of the zinc finger gene cluster in 19p12." *Genome Res* **8**(8): 791-808.
- Eshleman, J. R. and S. D. Markowitz (1995). "Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms." *Curr Opin Oncol* **7**(1): 83-9.

- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Guan, X. Y., P. S. Meltzer, et al. (1994). "Identification of cryptic sites of DNA sequence amplification in human breast cancer by chromosome microdissection [see comments]." *Nat Genet* **8**(2): 155-61.
- Gupta, P. K., A. Sahota, et al. (1997). "High frequency in vivo loss of heterozygosity is primarily a consequence of mitotic recombination." *Cancer Res* **57**(6): 1188-93.
- Gustafson, C. E., R. A. Alm, et al. (1993). "Effect of heat denaturation of target DNA on the PCR amplification." *Gene* **123**(2): 241-4.
- Gwakisa, P. S., S. J. Kemp, et al. (1994). "Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers." *Anim Genet* **25**(2): 89-94.
- Hastie, N. D. and R. C. Allshire (1989). "Human telomeres: fusion and interstitial sites." *Trends Genet* **5**(10): 326-31.
- Henke, W., K. Herdel, et al. (1997). "Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences." *Nucleic Acids Res* **25**(19): 3957-8.
- Hornigold, N., J. Devlin, et al. (1999). "Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer." *Oncogene* **18**(16): 2657-61.
- Inoue, H., H. Ishii, et al. (1997). "Sequence of the FRA3B common fragile region: implications for the mechanism of FHIT deletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14584-9.
- Ionov, Y., M. A. Peinado, et al. (1993). "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis." *Nature* **363**(6429): 558-61.
- Jaeger, U., G. D. Karth, et al. (1994). "Molecular mechanism of the t(14;18)--a model for lymphoid-specific chromosomal translocations." *Leuk Lymphoma* **14**(3-4): 197-202.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson, et al. (1985). "Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA." *Nature* **314**(6006): 67-73.
- JW, I., A. Baldini, et al. (1991). "Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(20): 9051-5.
- Kalitsis, P., Choo, K.H.A. (1997). "Centromere DNA of higher eukaryotes." *The Centromere* (Editor: K.H.A. Choo), Oxford University Press: 97-108.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, et al. (1992). "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors." *Science* **258**(5083): 818-21.
- Kambhampati, S., W. C. t. Black, et al. (1992). "Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications." *J Med Entomol* **29**(6): 939-45.

- Kawakami, K., J. Yasuda, et al. (1998). "Detection of DNA abnormalities by arbitrarily primed PCR fingerprinting: allelic losses in chromosome 10q in lung cancers." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(1): 153-7.
- Kersulyte, D., J. P. Woods, et al. (1992). "Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers." *J Bacteriol* **174**(22): 7075-9.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." *Cell* **87**(2): 159-70.
- Koebner, R. M. (1995). "Predigestion of DNA template improves the level of polymorphism of random amplified polymorphic DNAs in wheat." *Genet Anal* **12**(1): 63-7.
- Kohno, T., M. Kawanishi, et al. (1998). "Identification of CpG islands hypermethylated in human lung cancer by the arbitrarily primed-PCR method." *Hum Genet* **102**(3): 258-64.
- Kohno, T., K. Morishita, et al. (1994). "Homozygous deletion at chromosome 2q33 in human small-cell lung carcinoma identified by arbitrarily primed PCR genomic fingerprinting." *Oncogene* **9**(1): 103-8.
- Korenberg, J. R. and M. C. Rykowski (1988). "Human genome organization: Alu, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands." *Cell* **53**(3): 391-400.
- Krawczak, M. and D. N. Cooper (1991). "Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment." *Hum Genet* **86**(5): 425-41.
- Kresovich, S., Williams, J. G. K., McFerson, J. R., Routman, E. J., Schaal, B. A. (1992). "Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay." *Theor Appl Genet* **85**: 190-196.
- Kubelik, A. R. and L. J. Szabo (1995). "High-GC primers are useful in RAPD analysis of fungi." *Curr Genet* **28**(4): 384-9.
- Kuchiki, H. (1999). "Detection of DNA abnormalities by arbitrarily primed PCR fingerprinting: amplification of the MDM2 gene in a mediastinum fibrosarcoma." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **258**: 271-277.
- Lahiri, D. K. and J. I. Nurnberger, Jr. (1991). "A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies." *Nucleic Acids Res* **19**(19): 5444.
- Lee, C., R. Wevrick, et al. (1997). "Human centromeric DNAs." *Hum Genet* **100**(3-4): 291-304.
- Legius, E., D. A. Marchuk, et al. (1993). "Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis." *Nat Genet* **3**(2): 122-6.

- Lehrman, M. A., D. W. Russell, et al. (1987). "Alu-Alu recombination deletes splice acceptor sites and produces secreted low density lipoprotein receptor in a subject with familial hypercholesterolemia." *J Biol Chem* **262**(7): 3354-61.
- Levrn, O., Doggett, N. A., Auerbach, A. D. (1998). "Identification of Alu-Mediated Deletions in the Fanconi Anemia Gene FAA." *Human Mutation* **12**: 145-152.
- Lichten, M. and A. S. Goldman (1995). "Meiotic recombination hotspots." *Annu Rev Genet* **29**: 423-44.
- Lisitsyn, N. A., N. M. Lisitsina, et al. (1995). "Comparative genomic analysis of tumors: detection of DNA losses and amplification." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(1): 151-5.
- MacPherson, J. M., P. E. Eckstein, et al. (1993). "Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration." *Mol Cell Probes* **7**(4): 293-9.
- Maeda, T. (1999). "Analysis of genomic instability in squamous cell carcinoma of the head and neck using the random amplified polymorphic DNA method." *Cancer Letters* **138**: 183-188.
- Malkhosyan, S., J. Yasuda, et al. (1998). "Molecular karyotype (amplotype) of metastatic colorectal cancer by unbiased arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 10170-5.
- Marshall, B., G. Isidro, et al. (1996). "Insertion of a short Alu sequence into the hMSH2 gene following a double cross over next to sequences with chi homology [published erratum appears in *Gene* 1997 Sep 15;197(1-2):413]." *Gene* **174**(1): 175-9.
- Meunier, J. R. and P. A. Grimont (1993). "Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting." *Res Microbiol* **144**(5): 373-9.
- Mitelman, F., F. Mertens, et al. (1997). "A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia [see comments]." *Nat Genet* **15 Spec No**: 417-74.
- Mount, S. M. (1982). "A catalogue of splice junction sequens." *Nucleic Acids Research* **10**(2).
- Mullis, K. B. (1991). "The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion." *PCR Methods Appl* **1**(1): 1-4.
- Munroe, D. J. (1996). "IRS-Bubble PCR: An Effective Method for Representative Amplification of Human Genomic DNA Sequences from Complex Sources." *Methods* **9**(1): 106-12.
- Munroe, D. J., M. Haas, et al. (1994). "IRE-bubble PCR: a rapid method for efficient and representative amplification of human genomic DNA sequences from complex sources." *Genomics* **19**(3): 506-14.

- Newman-Smith, E. D., D. L. Shurland, et al. (1997). "Assignment of the dynamin-1 gene (DNM1) to human chromosome 9q34 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis." *Genomics* **41**(2): 286-9.
- Nuernberg, P., Zischler, H., Fuhrmann, E., Thiel, G., Losanova, T., Kinzel, D., Nisch, G., Witkowski, R., Epplen, J. T. (1991). "Coamplification of Simple Repetitive DNA Fingerprint Fragments and the EGFR Gene in Human Gliomas." *Genes, Chromosomes & Cancer* **3**: 79-88.
- Nystrom-Lahti, M., P. Kristo, et al. (1995). "Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer." *Nat Med* **1**(11): 1203-6.
- Offerhaus, G. J. A. (1992). "The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma." *Gastroenterology* **102**: 1612-1619.
- Okazaki, T., J. Takita, et al. (1996). "Detection of amplified genomic sequences in human small-cell lung carcinoma cells by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting." *Hum Genet* **98**(3): 253-8.
- Park, Y. H. and R. J. Kohel (1994). "Effect of concentration of MgCl₂ on random-amplified DNA polymorphism." *Biotechniques* **16**(4): 652-6.
- Peinado, M. A., S. Malkhosyan, et al. (1992). "Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10065-9.
- Penner, G. A., A. Bush, et al. (1993). "Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories." *PCR Methods Appl* **2**(4): 341-5.
- Premaratne, S., M. Helms, et al. (1993). "Enhancement of ethidium bromide fluorescence in double-stranded DNA reacted with chloroacetaldehyde." *Biotechniques* **15**(3): 394-6.
- Puget, N., D. Torchard, et al. (1997). "A 1-kb Alu-mediated germ-line deletion removing BRCA1 exon 17." *Cancer Res* **57**(5): 828-31.
- Rees, W. A., Yager, T. D., Korte, J., von Hippel, P. H. (1993). "Betaine Can Eliminate the Base Pair Composition Dependence of DNA Melting." *Biochemistry* **32**: 137-144.
- Riedy, M. F., W. J. d. Hamilton, et al. (1992). "Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR." *Nucleic Acids Res* **20**(4): 918.
- Russell, J. R., F. Hosein, et al. (1993). "Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis." *Mol Ecol* **2**(2): 89-97.
- Saitoh, Y., J. M. Bruner, et al. (1998). "Identification of allelic loss on chromosome arm 6p in human astrocytomas by arbitrarily primed polymerase chain reaction." *Genes Chromosomes Cancer* **22**(3): 165-70.
- Sardelli, A. (1993). "Plateau Effect-Understanding PCR Limitations." *Amplifications*(9): 1-5.

- Sarkar, G., S. Kapelner, et al. (1990). "Formamide can dramatically improve the specificity of PCR." *Nucleic Acids Res* **18**(24): 7465.
- Scaife, R. and R. L. Margolis (1990). "Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro." *J Cell Biol* **111**(6 Pt 2): 3023-33.
- Schierwater, B. and A. Ender (1993). "Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products." *Nucleic Acids Res* **21**(19): 4647-8.
- Schmid, S. L., McNiven, M.A., De Camilli, P. (1998). "Dynamin and its partners: a progress report." *Current Opinion in Cell Cycle* **10**: 504-512.
- Schon, E. A., R. Rizzuto, et al. (1989). "A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA." *Science* **244**(4902): 346-9.
- Schweder, M. E., R. G. Shatters, Jr., et al. (1995). "Effect of transition interval between melting and annealing temperatures on RAPD analyses." *Biotechniques* **19**(1): 38, 40-2.
- Sengstag, C. (1994). "The role of mitotic recombination in carcinogenesis." *Crit Rev Toxicol* **24**(4): 323-53.
- Silver, A. and R. Cox (1993). "Telomere-like DNA polymorphisms associated with genetic predisposition to acute myeloid leukemia in irradiated CBA mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4): 1407-10.
- Sineo, L., R. Martini, et al. (1993). "Analysis of genetic markers by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR)." *Boll Chim Farm* **132**(6): 201-2.
- Smit, V. T., C. J. Cornelisse, et al. (1988). "Analysis of tumor heterogeneity in a patient with synchronously occurring female genital tract malignancies by DNA flow cytometry, DNA fingerprinting, and immunohistochemistry." *Cancer* **62**(6): 1146-52.
- Smith, T. M., M. K. Lee, et al. (1996). "Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1." *Genome Res* **6**(11): 1029-49.
- Sobral, B. W. S., Honeycutt, R.J. (1993). "High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers." *Theor Appl Genet* **86**: 105-112.
- Sommer, R. and D. Tautz (1989). "Minimal homology requirements for PCR primers." *Nucleic Acids Res* **17**(16): 6749.
- Sood, A. K. and R. E. Buller (1996). "Genomic instability in ovarian cancer: a reassessment using an arbitrarily primed polymerase chain reaction." *Oncogene* **13**(11): 2499-504.
- Sowerby, S. J., M. A. Kennedy, et al. (1993). "DNA sequence analysis of the major breakpoint cluster region of the BCR gene rearranged in Philadelphia-positive human leukemias." *Oncogene* **8**(6): 1679-83.

- Spira, J., F. Wiener, et al. (1979). "Is trisomy cause or consequence of murine T cell leukemia development? Studies on Robertsonian translocation mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(12): 6619-21.
- Steindel, M., E. Dias Neto, et al. (1993). "Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains." *Mol Biochem Parasitol* **60**(1): 71-9.
- Stone, B. and W. Wharton (1994). "Targeted RNA fingerprinting: the cloning of differentially-expressed cDNA fragments enriched for members of the zinc finger gene family." *Nucleic Acids Res* **22**(13): 2612-8.
- Thein, S. L., Jeffreys, A. J. (1987). "Detection of somatic changes in human cancer DNA by DNA fingerprint analysis." *British Journal of Cancer* **55**: 353-356.
- Tracy, R. B., F. Chedin, et al. (1997). "The recombination hot spot chi is embedded within islands of preferred DNA pairing sequences in the *E. coli* genome [letter]." *Cell* **90**(2): 205-6.
- Urrutia, R., J. R. Henley, et al. (1997). "The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2): 377-84.
- Varadaraj, K. and D. M. Skinner (1994). "Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases." *Gene* **140**(1): 1-5.
- Venugopal, G., Mohapatra, S., Salo, D., Mohapatra, S. (1993). "Multiple Mismatch Annealing: Basis for Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **197**(3): 1382-1387.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R. (1989). "Allelotype of colorectal carcinoma." *Science* **244**: 207-211.
- Wahls, W. P. (1998). "Meiotic recombination hotspots: shaping the genome and insights into hypervariable minisatellite DNA change." *Curr Top Dev Biol* **37**: 37-75.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger, et al. (1991). "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material." *Biotechniques* **10**(4): 506-13.
- Weinberg, H.-S. (1997). "Molecular changes in the offspring of liquidators who emigrated to Israel from the Chernobyl disaster area." *Environmental Health Perspectives* **105**: 1479-1481.
- Weissensteiner, T. and J. S. Lanchbury (1996). "Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing." *Biotechniques* **21**(6): 1102-8.
- Welsh, J. and M. McClelland (1990). "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers." *Nucleic Acids Res* **18**(24): 7213-8.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, et al. (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6531-5.

- Wyatt, R. T., R. A. Rudders, et al. (1992). "BCL2 oncogene translocation is mediated by a chi-like consensus." *J Exp Med* **175**(6): 1575-88.
- Yap, E. P. and J. O. McGee (1991). "Short PCR product yields improved by lower denaturation temperatures." *Nucleic Acids Res* **19**(7): 1713.
- Yasuda, J., H. Kashiwabara, et al. (1996). "Detection of microsatellite instability in cancers by arbitrarily primed-PCR fingerprinting using a fluorescently labeled primer (FAP- PCR)." *Biol Chem* **377**(9): 563-70.